

Aus dem Institut für Klinische Physiologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. K. Hierholzer

Untersuchungen über die Ultrafiltrabilität von Zink durch synthetische Membranen und Bestimmung der Zink-Clearance bei Ratten

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ulrich Wolschner
aus Wuppertal

1903



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546623_0010

Druck: Copy-Center in Dahlem

Ladenbergstraße 2-4

1000 Berlin 33

Tel. 831 40 25

Aus dem Institut für Klinische Physiologie

Geschäftsführender Direktor: Prof.Dr.K.Hierholzer

Untersuchungen über die Ultrafiltrabilität von
Zink durch synthetische Membranen und Bestimmung
der Zink-Clearance bei Ratten

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an den Medizinischen Fachbereichen

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Ulrich Wolschner

aus Wuppertal

Referent : Prof. Dr. K. Hierholzer

Korreferent : Prof. Dr. Th. Günther

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am : 21.11.1983

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
1.0 <u>Einleitung</u>	5
2.0 <u>Methoden</u>	7
2.1 Ultrafiltrationsversuche	7
2.1.1 Ultrafiltration durch Zentrifugation	7
2.1.2 Ultrafiltration mit einer gerührten Zelle	8
2.1.3 Filtrandenherstellung	11
2.1.3.1 Herstellung der wässrigen Isotopenlösung	11
2.1.3.2 Markierung von Humanserum mit ^{65}Zn	11
2.1.4 Isotopen-Messung	11
2.1.5 Aktivitätsquotient (Ausbeute)	11
2.2 ^{65}Zn - Clearance-Versuche	13
2.2.1 Versuchstiere	13
2.2.2 Operatives Vorgehen	13
2.2.2.1 Narkose	13
2.2.2.2 Operation	13
2.2.2.3 Dauerinfusionslösung für die Clearance-Versuche	15
2.2.3 Versuchsablauf	16
2.2.4 Prinzip der Clearance-Versuche	18
2.2.5 Meßmethoden und Statistik	19
3.0 <u>Ergebnisse</u>	21
3.1 Ultrafiltrationsversuche	21
3.1.1 Filtration wässriger ^{65}Zn -Lösungen	21
3.1.1.1 Nachweis von ^{65}Zn -Membran-Interaktionen	27
3.1.2 Ultrafiltration von ^{65}Zn -markiertem Human-serum	30

3.1.2.1	Einfluß von Heparin auf die Ultrafiltrabilität von ^{65}Zn aus Humanserum	34
3.2	^{65}Zn - und ^{125}I -Natriumiothalamat-Clearance	37
4.0	<u>Diskussion</u>	42
4.1	Diskussion der Ultrafiltrationsversuche	43
4.1.1	Diskussion der Ultrafiltrationsmethoden	43
4.1.2	Verwendung des Radioisotops ^{65}Zn	44
4.1.3	Diskussion der Versuchsergebnisse zu 3.1.1	46
4.1.4	Diskussion der Versuchsergebnisse zu 3.1.2	48
4.2	Diskussion der Clearance-Versuche	50
4.2.1	Zur Methodik der Clearance-Versuche	50
4.2.2	Verwendung von ^{125}I -Natriumiothalamat als Referenz für die glomeruläre Filtration	52
4.2.3	Diskussion der Versuchsergebnisse zu 3.2	54
4.2.4	Der tubuläre Transport von Zink	56
5.0	<u>Zusammenfassung</u>	59
6.0	<u>Übersichtstabellen</u>	60
7.0	<u>Abkürzungen</u>	78
8.0	<u>Literaturverzeichnis</u>	79

1.0 Einleitung

Zwischen der ersten Gewinnung von metallischem Zink im Jahre 1597, die aus China berichtet wurde, vergingen fast 300 Jahre, bis von Raulin et al. in Frankreich im Jahre 1869 eine Beteiligung von Zink am Stoffwechsel von *Aspergillus niger* festgestellt wurde (Zit. bei 61). Die wesentlichen Erkenntnisse über die Bedeutung von Zink sind in einer großen Übersichtsarbeit von Vallee 1959 (61) zusammengefaßt worden. Danach fanden Lutz et al. im Jahre 1926 Zink in fast allen Organen von Menschen, Katzen und Ratten. Keilin et al. entdeckten 1940, daß Zink essentieller Bestandteil der Carboanhydratase im Erythrozyten ist (33). Die folgenden Untersuchungen zur Aufklärung der biochemischen Bedeutung von Zink waren wesentlich abhängig von den Entwicklungen der Analysentechnik. 1976 waren bereits mehr als 70 Metalloenzyme bekannt, die Zink enthalten (51). Bei den Untersuchungen über die klinischen Auswirkungen eines Zinkmangels wurden vor allem Wachstumsstörungen, Fertilitätsstörungen, Leber- und Hauterkrankungen festgestellt (24, 27, 48, 52). Der intrarenale Transport von Zink wurde bisher jedoch nicht befriedigend geklärt. Als Grundlage für die Berechnung der renalen Zinkclearance sowie für die Untersuchung von möglichen Resorptions- und Sekretionsvorgängen in der Niere wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst die Ultrafiltrabilität von ^{65}Zn durch artefizielle Membranen bestimmt. Diese Untersuchungen hatten zwei Ziele: Erstens sollte geklärt werden, ob eine Interaktion zwischen ^{65}Zn und den verwendeten Membranen aus synthetischen Polymeren besteht. Dazu wurden wässrige



^{65}Zn -Lösungen filtriert. Zweitens wollten wir die ultrafiltrable Fraktion von Zink im Serum bestimmen. Dazu verwendeten wir Humanserum, dem ^{65}Zn zugesetzt war. Wir stellten eine deutliche Interaktion zwischen den von uns verwendeten Membranen und Zink-Ionen fest. Die Membran konnte mit Zink-Ionen "beladen" werden. Zunächst wurde versucht, durch wiederholtes Spülen mit Wasser die Membran zu dekontaminieren, dies gelang jedoch nur unzureichend. Die Filtration einer wässrigen Heparin-Lösung führte zu einer deutlich stärkeren Freispülung von Restaktivität aus der Membran. Die vollständige Dekontamination gelang erst durch Filtration von unmarkiertem Humanserum. Der von uns bestimmte Anteil des ultrafiltrablen Serum-Zinks lag unter 1%. Daraus ergibt sich, daß mehr als 99% von Zink im Serum an Plasmaproteine gebunden und somit nicht ultrafiltrabel ist. Im letzten Teil der vorliegenden Arbeit wurden ^{65}Zn -Clearancebestimmungen an Ratten durchgeführt. In der Literatur fand sich lediglich ein Autor, der Zink-Clearancebestimmungen an Hunden durchgeführt hat (53). Wir konnten zeigen, daß Zink bei Ratten nur in sehr geringer Menge über die Niere zur Ausscheidung gebracht wird. Gleichzeitig wurde die glomeruläre Filtrationsrate mit Hilfe der ^{125}I -Natriumiothalamat (Glofil^R)-Clearance gemessen. Der Quotient aus unkorrigierter ^{65}Zn -Clearance zu ^{125}I -Natriumiothalamat-Clearance beträgt 0,6-0,9%, berücksichtigt man die geringe Ultrafiltrabilität von 0,61% im Durchschnitt, so beträgt der korrigierte Clearance-Quotient 0,95-1,47 (95-147%).

2.0 Methoden

2.1 Ultrafiltrationsversuche

2.1.1 Ultrafiltration durch Zentrifugation

Bei dieser Ultrafiltrationsmethode wird die Zentrifugalkraft benutzt, um den Filtranden durch eine konusförmige Ultrafiltrationsmembran zu pressen (vgl. Abb.1).

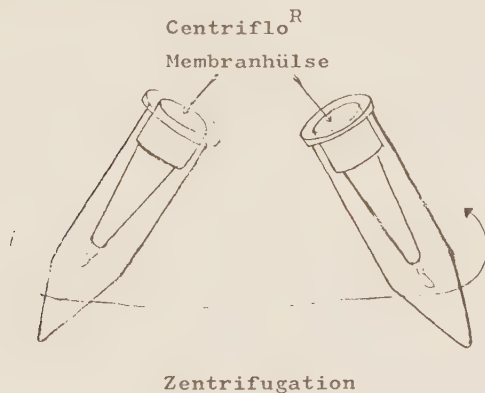


Abb.1:Funktionsdarstellung der Zentrifugen-Ultrafiltrationsmethode

In einem Zentrifugenglas mit konischem Träger wurde ein Centriflo^R Filterhütchen (Fa.Amicon, Witten/Ruhr) Typ CF 25 mit dem Filtranden gefüllt und in der Zentrifuge bei ca.750 g (3000 U/min) filtriert. Die vom Hersteller angegebene "nominelle Trennleistung beträgt 25000 Molekulargewichtseinheiten. Diese Abtrennung erfolgt nach Angaben des Herstellers für Myoglobin zu mehr als 85%, Albumin zu mehr als 90% und Serumproteine insgesamt zu mehr als 97% (Fa.Amicon, Ultrafiltration ,Anleitung und Katalog, Ausgabe 1980). Nach der Filtration befindet sich

das gesamte Filtrat im Zentrifugenglas , der retinierte Anteil des Filtranden verbleibt im Filterhütchen. Eine fraktionierte Filtration ist mit der Methode der Zentrifugenultrafiltration nicht möglich. Nach jeder Filtration wurden Zentrifugenglas und Träger gereinigt und unter fließendem Wasser für mindestens 24 Stunden aufbewahrt. Eine Restaktivität an den Geräteteilen wurde vor jedem Versuch durch Leermessungen ausgeschlossen. Die Filterhütchen wurden jeweils nur in einem Versuch verwendet.

2.1.2 Ultrafiltration mit einer gerührten Zelle

Wir verwendeten eine Ultrafiltrationszelle mit Magnetührstab (Fa.Amicon,Witten/Ruhr ,Modell 4o2) und mit einer Diaflo^R Ultrafiltrationsmembran (Fa.Amicon,Witten/Ruhr ,Typ PM 10). Die in Abb.2 schematisch dargestellte Apparatur war in einem Kühlschrank bei 4°C untergebracht.

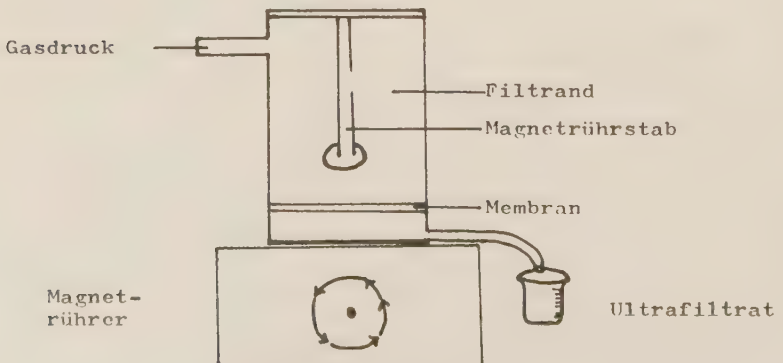


Abb.2 : Ultrafiltrationsapparatur mit Magnet-rührer

Zur Vermeidung der Konzentrationspolarisation stellten wir die Ultrafiltrationszelle während des Filtrationsvorganges auf einen Magnetrührer. Nach Einfüllen des Filtranden in die Kammer wurde bei langsamer Rührung unter einem Gasdruck (CO_2 -Luft-Gemisch) von $3,92 \cdot 10^5 \text{ Nm}^{-2}$ filtriert. Die Ableitung des Filtrates erfolgte über einen dünnen Plastischlauch, wodurch eine fraktionierte Sammlung des Ultrafiltrates möglich war. Die von uns verwendete Ultrafiltrationsmembran Diaflo^R Typ PM 10 besteht nach Herstellerangaben aus synthetischen Polymeren. Auf der Oberseite der Membran sitzt eine dünne, etwa $0,1 - 0,15 \mu\text{m}$ dicke Schicht mit Poren in der durch den Ansatz bestimmten Größe. Daraus ergibt sich die für die Membran spezifische "Nominelle Trennleistung" (cut off) von 10000 Molekulargewichtseinheiten. Hierzu gibt der Hersteller die in Abb. 3 dargestellte Membrancharakteristik (Amicon, "Ultrafiltration, Anleitung und Katalog", Ausgabe 1980).

Weitere Eigenschaften der Membran sind nach Angaben des Herstellers die pH-Verträglichkeit im Bereich von pH 1 - 13, sowie die Stabilität gegenüber allen Biopolymeren. Für jeden Versuch verwendeten wir eine neue, zuvor in aqua destillata gewässerte Membran. Nach jedem Filtrationsvorgang wurde die Ultrafiltrationskammer in alle Einzelteile zerlegt und sehr sorgfältig unter fließendem Wasser gereinigt. Anschließend wurden die Einzelteile für mindestens 24 h in

fließendem Wasser aufbewahrt. Vor jedem neuen Versuch wurde eine Leerfiltration mit anschließender Leermessung zum Ausschluß einer Restkontamination durchgeführt.

Substanz	Molekulargewicht (nominell)	Abtrennung (%)
D-Alanin	89	0
Tryptophan	204	0
Inulin	5000	0
Myoglobin	18000	85
Albumin	67000	98
Aldolase	142000	98
IgG	160000	98
Apoferitin	480000	98
IgM	960000	98

Abb. 3 : Membrancharakteristik Diaflo^R Typ PM 10

2.1.3 Filtrandenherstellung

2.1.3.1 Herstellung der wässrigen Isotopenlösung

Wir verwendeten trägerfreies $^{65}\text{ZnCl}_2$ in 0,5 m HCl-Lösung mit der spezifischen Aktivität von 1,7 mCi /mg und der spezifischen Energie von 1120 KeV (NEN New England Nuclear, Boston, Mass.). Die Halbwertszeit von ^{65}Zn beträgt 245 Tage. Die ^{65}Zn -Stammlösung wurde durch Zugabe von 5ml NaCl-Lösung (0,9 %) hergestellt. 100 μl der Stammlösung enthielten 10 μCi ^{65}Zn , dies entspricht der gesetzlichen Freigrenze. (Verordnung über den Schutz vor Schäden durch ionisierende Strahlen vom 13.10.1976)

2.1.3.2 Markierung von Humanserum mit ^{65}Zn

Wir verwendeten Frischblut und erhielten durch Zentrifugation Serum, das keinerlei gerinnungshemmende Zusätze enthielt. Zugegeben wurden jeweils 10-100 μl der Stammlösung (1-10 μCi) auf 20 -50 ml Serum. Die Inkubationszeit betrug 5-10 Minuten.

2.1.4 Isotopen -Messung

Die Messung der Aktivitäten erfolgte mit einem 2-Kanal-Auto-Gamma-Scintillation-Spektrometer (Fa. Packard, Downers Grove, Illinois, Modell 5260)

2.1.5 Aktivitätsquotient (Ausbeute)

Als Aktivitätsquotient bezeichnen wir die Aktivität pro Volumeneinheit im Ultrafiltrat, im Verhältnis zur Aktivität pro Volumeneinheit im

Filtranden. Die Berechnungen erfolgten nach der Formel :

$$\frac{\text{Ultrafiltrat (cpm/ml)}}{\text{Filtrand (cpm/ml)}} \cdot 100 = \text{Aktivitätsquotient (in \% der Ausgangsaktivität)}$$

Bei der Ultrafiltration von Serum wurden nur Ultrafiltrate akzeptiert, deren Proteingehalt weniger als 0,5 % der Gesamtplasmaproteinkonzentration enthielt. Die Proteinbestimmung im Filtranden und im Ultrafiltrat erfolgte mit der Halbmikromethode nach Lowry(34). Der pH-Wert des Humanserums wurde mit Hilfe des Blut-Mikro-pH-Meter (Radiometer Kopenhagen, BMS-MK 2) gemessen.

2.2 ⁶⁵Zn-Clearance-Versuche

2.2.1 Versuchstiere

Wir verwendeten drei 320-400 g schwere männliche Albinoratten vom Stamm Sprague Dawley (Zentralinstitut für Versuchstierkunde, Hannover) und drei 265-305 g schwere männliche Albinoratten vom Stamm Wistar (Fa. Ivanos, Kissleg, Allgäu). Die Versuchstiere wurden ca. 12 Stunden vor Versuchsbeginn von ihrem Futter, Altromin-R, Standarddiät (Fa. Altromin, Lage, (Na)=3,1g/kg, (K)=7,7g/kg), abgesetzt. Bis zum Versuchsbeginn hatten die Tiere freien Zugang zur Trinkflüssigkeit (Leitungswasser).

2.2.2 Operatives Vorgehen

2.2.2.1 Narkose

Zur Narkose erhielten die Versuchstiere als Einzeldosis 120mg/kg Körpergewicht des Barbiturates Inactin^R (Fa. Promonta, Hamburg) intraperitoneal injiziert.

2.2.2.2 Operation

Die narkotisierten Tiere wurden in Rückenlage auf einen beheizten Operationstisch gelegt. Die Körpertemperatur wurde bei 36,5°C konstant gehalten, indem eine rectal eingeführte Temperatursonde mit der Heizung des Operationstisches rückgekoppelt wurde. Nach der Anlage eines medianen Hautschnittes über der Trachea wurde diese dargestellt und vorsichtig zwischen zwei Knorpelspangen eröffnet. Es wurde sodann eine mit Hand ausgezogene konische Trachealkanüle aus Polyäthylen eingebunden. Durch diese Kanüle konnte bei Bedarf Schleim abgesaugt werden, um Ventilations-

störungen zu vermeiden. Nun wurde die rechte V.jugularis zum Anschluß der Dauerinfusion mit einem Polyäthylenkatheter der Stärke PE 0,5 katheterisiert. Die Dauerinfusion wurde über eine Infusionspumpe Unita I (Fa. Braun, Melsungen) gesteuert. Als Dauerinfusion erhielten die Tiere 3,75 ml/h einer der Extrazellulärflüssigkeit angepaßten Lösung (Stereofundin^R, Braun, Melsungen) mit 2,5 % Mannit, um eine gleichmäßige Diurese zu erzeugen. Die Zusammensetzung von Stereofundin^R ist wie folgt: Natrium 140, Kalium 4,0, Calcium 2,5, Magnesium 1,0, Chlorid 106, Lactat $45 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$. Zur Blutdrucküberwachung wurde danach die linke A. carotis katheterisiert. Die Druckübertragung erfolgte mit einem Statham-Druckwandler auf einen 4-Kanal-Schreiber (Fa. Linseis GmbH, Selb). Zur Freilegung der Nieren wurde entlang der linea alba ein Haut- und Muskelschnitt gelegt. Nach der Präparation der beiden Ureteren wurden mit Hand ausgezogene Ureterkatheter aus Polyäthylen eingebunden und seitlich durch die Bauchdecke herausgeleitet. Die Hautschnitte wurden soweit wie möglich durch Klammerung verschlossen. Am Ende der Operation erhielten die Tiere zum Ausgleich von intraoperativen Flüssigkeitsverlusten eine einmalige Injektion von 2 ml Stereofundin-Lösung i.v. injiziert.

2.2.2.3 Dauerinfusionslösung für die Clearance-Versuche

Die Dauerinfusionslösung enthielt das Radioisotop ^{65}Zn und mit ^{125}I markiertes Natriumiothalamat. Wir verwendeten ^{65}Zn wie unter 2.1.3.1 beschrieben. ^{125}I -Na-Iothalamat wurde in 0,9%iger NaCl-Lösung von der Firma Amersham England Buchler (Braunschweig) geliefert. ^{125}I ist ein Gammastrahler mit einer Halbwertszeit von 63 Tagen. Die gelieferte Lösung enthielt $200\ \mu\text{Ci}$ ^{125}I in $400\ \mu\text{l}$ Lösung. Dies entspricht einer Konzentration von $0,5\ \mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ Lösung. Die Freigrenze in unserem Labor für den Umgang mit ^{125}I beträgt $1\ \mu\text{Ci}$. (Verordnung über den Schutz vor Schäden durch ionisierende Strahlen vom 13.10.1976) Die für die Durchführung der Clearance-Versuche benötigten Mengen lagen jeweils unterhalb der Freigrenze und wurden vor Versuchsbeginn aus der im Institut für Nuklearmedizin gelagerten Stammlösung entnommen.

2.2.3 Versuchsablauf

Während der Vorperiode von 60 Minuten nach der Operation erhielten die Tiere 3,75 ml Stereofundin^R als Dauerinfusion mit 2,5% Mannit. In dieser Zeit wurde der Zustand der operierten Tiere anhand des Blutdruckes, der Atmung und der Körpertemperatur kontrolliert. Die Diurese stellte sich in dieser Zeit auf einen stationären Wert ein. Der Versuchsablauf ist in Abb.4 schematisch dargestellt. Zum Versuchsbeginn (Zeitpunkt 0) erhielten die Tiere eine Primärdosis der beiden Isotopenlösungen als Stoßinjektion. Die Primärdosis diente dazu, einen schnellen Konzentrationsanstieg der Isotopen im Plasma zu erreichen. Als Primärdosis wurden 2 μCi ^{65}Zn und 0,2 μCi ^{125}I -Natriumiothalamat in 2 ml Stereofundinlösung intravenös injiziert. Als Dauerinfusion erhielten die Tiere 4 μCi ^{65}Zn und 0,4 μCi ^{125}I -Natriumiothalamat in 3,75 ml Stereofundin^R-Lösung pro Stunde. Der Urin wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäßen (Fa. Eppendorf Gerätebau, Hamburg) unter Paraffinöl seitengetreunt gesammelt und der Urinfluß durch Differenzwägung auf einer Laborwaage (Fa. Mettler, Anzeigegenauigkeit $\pm 0,05$ p) bestimmt. Die Urinsammelperioden betrugen 30 Minuten. Am Ende einer jeden Sammelperiode wurde aus der A.carotis ca. 0,5 ml Blut über den Katheter entnommen und sogleich nach der Entnahme zentrifugiert. Zur Messung wurden jeweils 100 μl Plasma und entsprechend 100 μl Urin verwendet. Es wurden jeweils vier Sammelperioden pro Versuchstier durchgeführt.

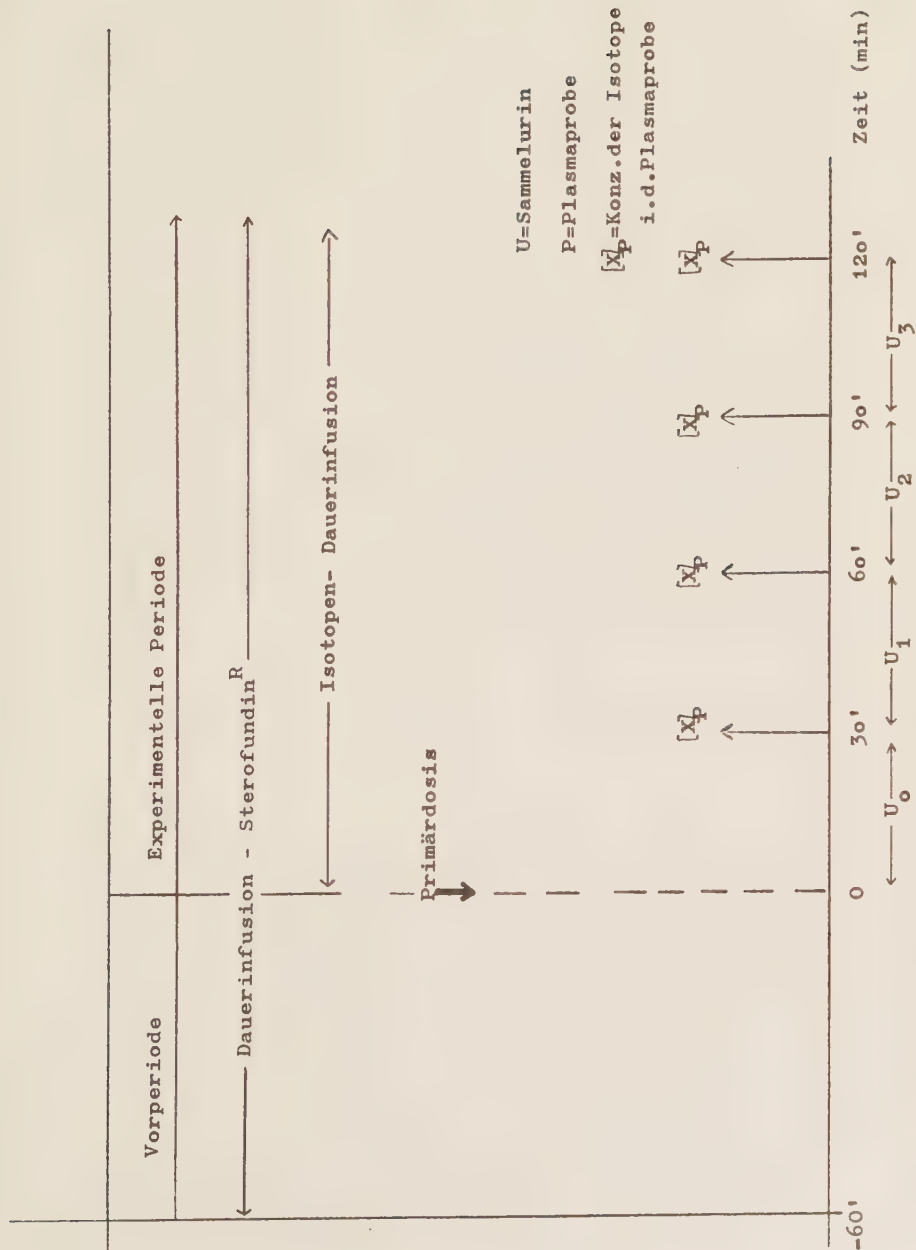


Abb. 4: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes

2.2.4 Prinzip der Clearance-Versuche

Die Messung der Clearance für ^{65}Zn und ^{125}I -Natriumiothalamat erfolgte gleichzeitig. Aus der Literatur ist bekannt, daß ^{125}I -Natriumiothalamat entsprechend dem Inulin in der Niere nur filtriert, nicht jedoch sezerniert oder rückresorbiert wird (7,32). Die Clearance von ^{125}I -Natriumiothalamat ist damit ein Maß der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und bietet in unserem Versuch einen Referenzwert der Nierenfunktion. Die ^{65}Zn -Clearance ist möglicherweise das Ergebnis von Filtration, Sekretion und Rückresorption entlang der Einzelnephrone. Der Klärwert wird in Milliliter Plasma angegeben, die pro Minute von der entsprechenden Substanz vollständig befreit werden. Die Berechnung der Clearance erfolgte nach der Formel:

$$C = \frac{[X]_U}{[X]_P} \cdot \dot{V}_u \quad (\text{vgl. dazu 7.0})$$

Der Quotient aus dem Klärwert einer Substanz X und dem Klärwert für ^{125}I -Natriumiothalamat stellt quantitativ anschaulich den prozentualen Anteil der in der Niere filtrierten Substanzmenge von X dar, der am Ende aller Sekretions- und Rückresorptionsvorgänge zur Ausscheidung gelangt. Dies gilt allerdings nur für Substanzen, die frei filtrierbar, d.h. nicht an Makromoleküle gebunden sind. Liegt wie unten gezeigt beim Zink eine erhebliche Bindung an Plasmaproteine vor, so muß die Clearance um den ultrafiltrablen Zink-Anteil korrigiert werden.

2.2.5 Meßmethoden und Statistik

Der Nachweis der verwendeten Isotope ^{65}Zn und ^{125}I -Natriumiothalamat (Glofil^R) wurde durch Gammazählung in einem Kristall-Szintillationsspektrometer durchgeführt. Die Energiebereiche der beiden verwendeten Isotope sind sehr unterschiedlich, wodurch eine gleichzeitige Messung in einem 2-Kanal-Auto-Gamma-Szintillationsspektrometer (Fa. Packard, Illinois, Modell 5260) möglich war.

Die Einstellung des Energiebereiches ("full scale") für ^{65}Zn war 2,0 MeV, der Energiebereich für ^{125}I -Natriumiothalamat war 0,25 MeV. Ausgehend von diesen Einstellungen wurde eine sog. Fenstereinstellung vorgenommen, die die wechselseitige Einstrahlung in den anderen Kanal ("cross talk") möglichst gering hielt. Mit der unteren Begrenzung ("lower level") wird der Background so weit wie möglich unterdrückt. Die Fensterweite ("window") wurde so gewählt, daß bei möglichst großer Zählerausbeute eine möglichst geringe Einstrahlung in den anderen Kanal erfolgt.

Die Einstellung für ^{65}Zn (Kanal 1) war: lower level 200 Skt, window 400 Skt. Die Einstellung für ^{125}I (Kanal 2) war: lower level 100 Skt, window 40 Skt.

Bei dieser Einstellung lag der "cross talk" von ^{125}I in den ^{65}Zn -Kanal unter 1%, der "cross talk" von ^{65}Zn in den ^{125}I -Kanal betrug 1,5%. Wir haben die Berechnung aufgrund von Zählraten von mindestens 2000 counts ohne Berücksichtigung des "cross talk" durchgeführt. Der Background wurde nach mehrfacher

Bestimmung mittels "background subtract" automatisch abgezogen. (^{65}Zn : 42 cpm , ^{125}I : 5 cpm).

Zur Standardisierung der Füllmenge in den Zählröhrchen wurden diese mit 2ml aqua dest. gefüllt und damit im Szintillationsspektrometer die Höheneinstellung vor dem Bohrloch durchgeführt. Dies diente dazu, eine möglichst hohe Zählrate zu erzielen.

Zur statistischen Auswertung wurden von allen Versuchsmittelwerten die Standardabweichung (SD) und der Standardfehler des Mittelwertes (SE) berechnet.

Dazu wurden folgende Formeln verwendet:

für die Standardabweichung (mittlere quadratische Abweichung): $SD = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$

für den Standardfehler (SE, bzw. SEM = "standard error of the mean"): $SE = \frac{SD}{\sqrt{n}}$

In beiden Formeln bedeutet $\bar{x}$ errechneter Mittelwert und n die Anzahl der Meßwerte.

3.0 Ergebnisse

3.1 Ultrafiltrationsversuche

3.1.1 Filtration wässriger ^{65}Zn - Lösungen

In Pilotversuchen wurden wässrige ^{65}Zn -Lösungen in einer Zentrifuge durch Membranhülsen filtriert. Dabei sollte festgestellt werden, ob ^{65}Zn das Filterhütchen frei passieren kann oder ob eine Bindung von ^{65}Zn in der Membran auftritt, zum Beispiel durch Adsorption an Membranbestandteile. Es wurden in jedem Filtrationsvorgang neue Membranhülsen Centriflo^R Typ CF 25 verwendet und jeweils 5 ml Filtrandenvolumen eingefüllt. Die Filtration der wässrigen Lösungen erfolgte sehr rasch, das Filtrandenvolumen wurde vollständig filtriert. In Tabelle 1 sind die Ergebnisse dieser Pilotversuche zusammengestellt. Es wurden in vier Versuchen mit unterschiedlichen Filtrandenaktivitäten 20 Filterhütchen verwendet. Neben der Aktivität im Filtranden (a), dem Filtratvolumen in % des Filtrandenvolumen (b), der Dauer der Vorwässerung der Filterhütchen (c), der Anzahl der im Versuch verwendeten Filterhütchen (d), ist der Aktivitätsquotient (e) (vgl. 2.1.5) angegeben. Ein Aktivitätsquotient von 100% konnte in keinem der Pilotversuche nachgewiesen werden. Ein Einfluß der Ausgangsaktivität im Filtranden oder der Vorwässerungsdauer der Filterhütchen auf den Aktivitätsquotienten ließ sich nicht feststellen.

Tab.1: Filtration wässriger ^{65}Zn -Lösungen mit
der Zentrifugen-Ultrafiltrationsmethode

(a)	(b)	(c)	(d)	(e)
$\mu\text{Ci/l}$	%	h	n	%
45	~ 100	1	6	81
100	~ 100	3	3	75
160	~ 100	1	3	30
200	~ 100	1	8	85

Zur weiteren Untersuchung der Filtrabilität wässriger ^{65}Zn -Lösungen wurde eine Methode verwendet, die eine fraktionierte Filtration ermöglicht. Bei der Verwendung einer gerührten Ultrafiltrationszelle zur Filtration wässriger ^{65}Zn -Lösungen konnte der Filtrationsvorgang unterbrochen werden. Wir verwendeten in jedem Filtrationsvorgang eine neue Membran Diaflo^R Typ PM 10, die zuvor einige Stunden in aqua destillata gelagert worden war. Es wurde untersucht, welchen Einfluß die Ausgangsaktivität im Filtranden, das Filtratvolumen und die Vorbehandlung der Membran auf die Größe des Aktivitätsquotienten haben. In Tabelle 2 sind die Versuchsergebnisse nach aufsteigender Filtrandenaktivität bei verschiedenen Filtrandenvolumina zusammengestellt.

Tab.2: Filtration wässriger ^{65}Zn -Lösungen mit einer gerührten Zelle

Versuch	(a) Filtrand $\mu\text{Ci/l}$	(b) Filtranden- volumen ml	(c) Filtrat- volumen % von (b)	(d) Vorwässerungs- dauer h	(e) Aktivitäts- quotient (Ausbeute) %
A	25	20	37	2	13,5
B	100	20	50	5	58,3
C	250	20	100	24	47,9
D	33	30	40	2	49,7
E	25	40	25	5	52,0
F	50	40	50	3	80,0
G	75	40	100	24	63,0

Die im Filtranden eingesetzte Aktivität konnte in keinem der Versuche vollständig im Filtrat wieder - gefunden werden. Die Größe des Aktivitätsquotienten war unabhängig von der Ausgangsaktivität und der Vorbehandlung der Membran. In Abbildung 5 ist der mittlere Aktivitätsquotient in Bezug auf das Filtratvolumen in Prozent des Filtrandenvolumens graphisch dargestellt. Der Aktivitätsquotient steigt mit zunehmendem Filtratvolumen in Form einer Sättigungskurve an, erreicht jedoch in keinem Versuch 100 %. Die Vorstellung eines Membransättigungsvorganges wird verstärkt durch die Aufschlüsselung der Versuche B, D und E (vgl. Tab. 2). In diesen Versuchen wurde der Filtrand in drei etwa gleich großen Fraktionen filtriert und jeweils der Aktivitätsquotient in den Filtratfraktionen bestimmt. In Abbildung 6 sind diese Versuche graphisch dargestellt. Es zeigt sich ein deutlicher Anstieg des Aktivitätsquotienten zwischen der ersten und zweiten Filtratfraktion, sowie ein geringerer Anstieg zur dritten Fraktion.

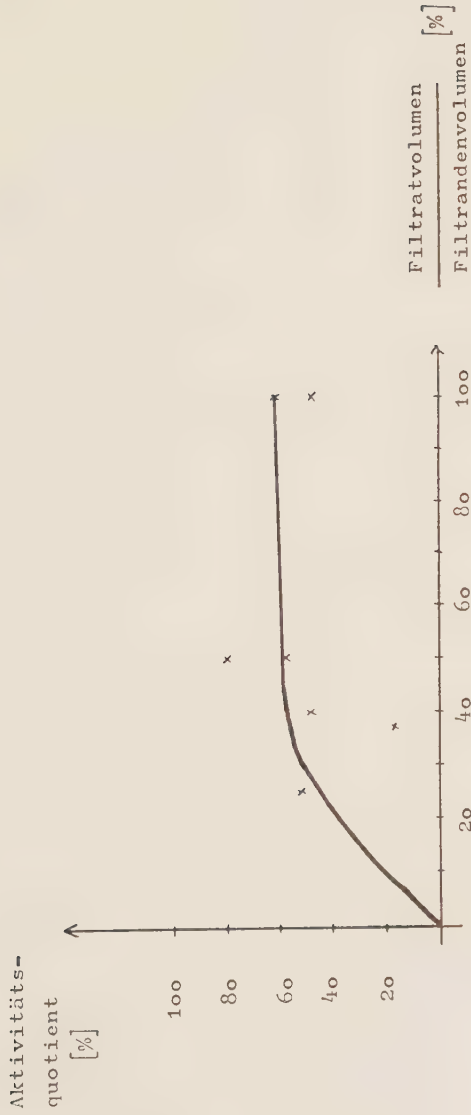


Abb. 5 : Aktivitätsquotient in Bezug auf den prozentual
 filterten Anteil des Filtrandenvolumens

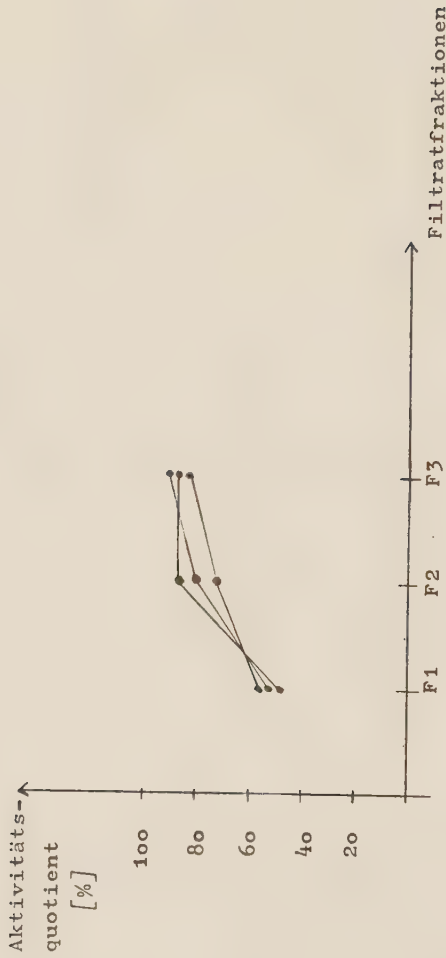


Abb. 6 : Fraktionierte Filtration wässriger ^{65}Zn -Lösungen

3.1.1.1 Nachweis von ^{65}Zn -Membran -Interaktionen

Sowohl in den Pilotversuchen mit Filterhütchen als auch bei der Verwendung von Membranscheiben verblieb eine erhebliche Restaktivität im Filter. Durch Abspülen der Membran und der Geräteteile konnte nur ein vernachlässigbar geringer Teil dieser Restaktivität "abgespült" werden. Bei den Versuchen, durch Nachfiltration von aqua destillata aus der kontaminierten Membran die Restaktivität freizuspülen, zeigte sich, daß auch mit größeren Mengen an Wasser nur ein geringer Teil der Restaktivität freigespült werden konnte. Unter der Vorstellung, daß Heparin sich als Polyanion an Zinkionen ähnlich binden könnte wie an Calcium - ionen, filterten wir wässrige Heparinlösungen. Es zeigte sich, daß ein größerer Teil der Restaktivität aus der kontaminierten Membran freigespült werden konnte (s.u.). Anschließend wurde durch dieselbe Membran Humanserum filtriert. Sowohl im Ultrafiltrat, als auch im Überstand fand sich erhebliche Restaktivität. Eine Bilanzierung zeigte, daß erst nach der Serumfiltration die vollständige Dekontamination der Membran erfolgt war. Dies wurde auch nachgewiesen, indem die Membran selbst nach Abschluß des Filtrationsvorganges im γ -Szintillationsspektrometer gemessen wurde. Am Beispiel von Versuch B (Tab.2) ist in Abb.7 schematisch ein Versuch zur Dekontamination einer mit ^{65}Zn beladenen Membran dargestellt. In die

Ultrafiltrationskammer wurden zunächst 20 ml aqua destillata egefüllt und davon drei Fraktionen zu je 5 ml filtrierte. Den verbliebenen 5ml wurden 0,2 ml Heparin (1000 I.E.) zugegeben und weiter filtrierte. Nach vollständiger Filtration der wässrigen Lösung wurden 12 ml Humanserum in die Kammer egefüllt und sodann bis zum Filtrationsgleichgewicht ultrafiltriert.



Abb.7: Filtration von H_2O (I), $\text{H}_2\text{O} + 1000$ I.E. Heparin (II) und Humanserum(III) zur Dekontamination einer mit ^{65}Zn "beladenen" Membran Diaflo^R Typ PM 10 . (Einzelheiten s. Text)

In Tabelle 3 sind die Versuche zur Dekontamination der Membranen zusammengestellt, die zuvor in den Versuchen zur Filtration wässriger ^{65}Zn -Lösungen verwendet wurden. (vgl. Tab. 2). Hinzuzufügen ist, daß in den Versuchen B, C und D im Serumüberstand nach Erreichen des Filtrationsgleichgewichtes ebenfalls ^{65}Zn -Aktivität nachgewiesen werden konnte.

Tab. 3: Versuche zur Dekontamination der Ultrafiltrationsmembranen mit verschiedenen Lösungen

Versuch (vgl. Tab. 2)	Dekontamination der Membran durch Filtration von		
	H_2O	H_2O +Heparin	Humanserum
B	+	++	+++
C	+	(-)	+++
D	+	++	+++
E	+	(-)	+++
F	+	(-)	+++
G	+	(-)	(-)

In dieser Tabelle bedeuten:

+ = geringer Dekontaminationseffekt

++ = zusätzlicher Dekontaminationseffekt
durch Heparin

+++ = zusätzlicher Dekontaminationseffekt
durch Humanserum

(-) = nicht geprüft

3.1.2 Ultrafiltration von ^{65}Zn -markiertem Humanserum

Die Ultrafiltration von ^{65}Zn -markiertem Humanserum mit Hilfe einer gerührten Zelle erlaubt eine fraktionierte Gewinnung des Ultrafiltrates. Wir verwendeten Humanserum, das unmittelbar vor Versuchsbeginn aus Frischblut mittels Zentrifugation gewonnen wurde. Es enthielt keinerlei gerinnungshemmende Zusätze. Nach Zugabe des Isotops ^{65}Zn in einem Volumen von 10-100 μl (dies entspricht 1 -10 μCi) zu 20-50 ml Serum wurde eine Inkubationszeit von 10 Minuten abgewartet. Vor Beginn der Filtration wurde eine Probe zur Bestimmung der Ausgangsaktivität entnommen. Nach der Filtration wurde die Aktivität im Ultrafiltrat sowie im Überstand gemessen. In Abbildung 8 ist exemplarisch die Aktivität in den einzelnen Ultrafiltratfraktionen von je 1 ml dargestellt. Nach einer Anstiegsphase von fünf Fraktionen, währenddessen die Membran " beladen " wurde, war eine Plateauphase erreicht. Die Aktivität im Ultrafiltrat während der Plateauphase entspricht der eigentlichen Ultrafiltrabilität von ^{65}Zn . In den Versuchen wurde praktisch bis zum Erreichen des Filtrationsgleichgewichtes filtriert. Letzteres wurde angenommen, wenn bei einer Filtrationszeit von mehr als 30 Minuten kein meßbares Ultrafiltrat abgepreßt werden konnte. Während im Ultrafiltrat nur ein geringer Teil der Ausgangsaktivität des Filtranden zu finden war, stieg die Aktivität im Überstand mit

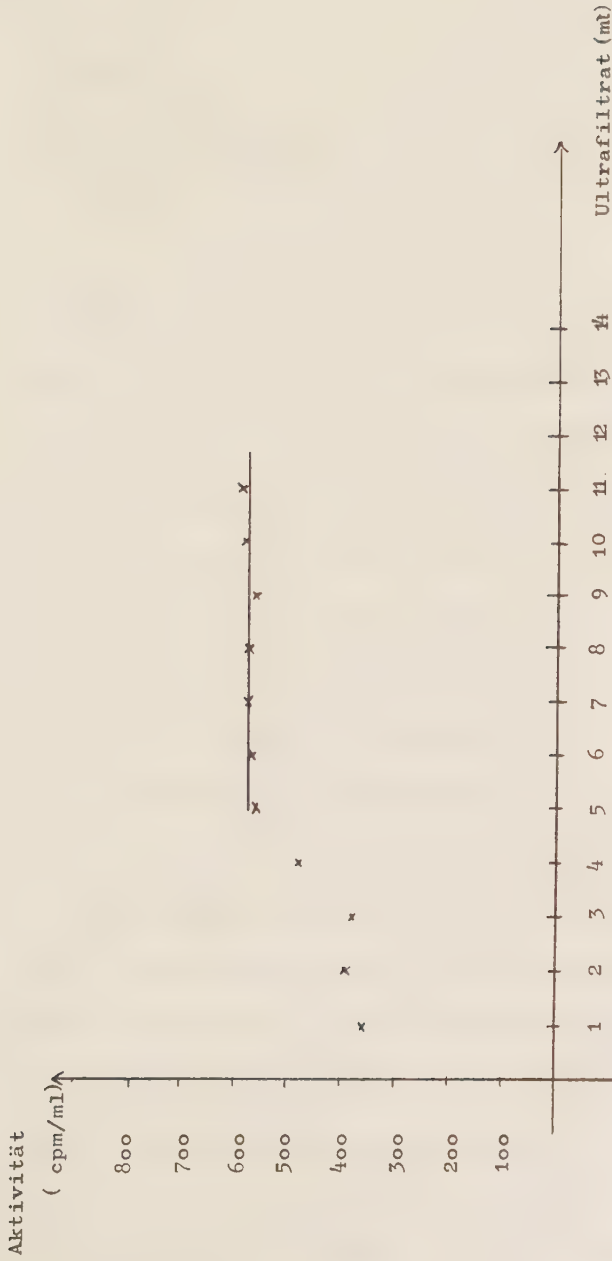


Abb. 8 : Aktivitätsanstieg und Plateauphase bei der Ultrafiltration von ^{65}Zn -markiertem Humanserum (Versuch K)

dem Abpressen der Abpressen der proteinfreien Phase an. Nach Filtration von ca. 50% des Ausgangsvolumens war das Filtrationsgleichgewicht erreicht und die Aktivität im Überstand auf etwa das Doppelte der Ausgangsaktivität angestiegen. Die Dichtigkeit der Membran und der Apparatur konnte anhand der Proteinbestimmungen im Ultrafiltrat kontrolliert werden. Die Proteinkonzentration im Ultrafiltrat war stets geringer als 0,5% der Ausgangskonzentration im verwendeten Serum. In Tabelle 4 sind die Ultrafiltrationsversuche mit ^{65}Zn -markiertem Humanserum zusammengestellt. Neben der Ausgangsaktivität im Filtranden, der mittleren Aktivität im Ultrafiltrat während der Plateauphase und der Aktivität im Überstand, ist als Filtratfraktion das filtrierte Volumen in % des Filtrandenvolumens angegeben. Bei der Berechnung der Filtratfraktion wurde das unmittelbar unter der Membran gelegene Totraumvolumen nicht berücksichtigt, sodaß die angegebenen Werte Minimalwerte sind. Die Versuche sind nach fallender Filtrandenaktivität geordnet. Der Mittelwert des ultrafiltrablen ^{65}Zn aus Humanserum betrug 0,61% . Einzelversuche, in denen der pH-Wert im Filtranden durch Einleiten von CO_2 oder durch Zugabe von 0,1 m HCl-Lösung angesäuert oder durch Zugabe von 8,4%-iger NaHCO_3 -Lösung alkalisiert wurde, zeigten keine Veränderungen der Ultrafiltrabilität von ^{65}Zn durch Änderung des pH im Bereich von 7,3 - 8,0 .

Tab. 4:

Ultrafiltration von ^{65}Zn -markiertem Humanserum
 durch eine Diaflo^R Ultrafiltrationsmembran
 Typ PM 10

Versuch	Filtrand	Ultrafiltrat (Plateauwerte)		Überstand	Filtrat- fraktion
	cpm/ml	cpm/ml	%	cpm/ml	%
H	49350	660	1,33	121930	55
I	48150	170	0,35	155865	56
K	40080	560	1,40	110910	64
L	40000	168	0,42	80216	57
M	39300	126	0,30	85624	50
N	34700	100	0,29	77086	50
O	33620	141	0,42	63694	47
P	33430	225	0,66	60161	47
Q	31580	115	0,36	60143	49

$$\bar{x} \pm \text{SE} = 0,61 \pm 0,15 \%$$

3.1.2.1 Einfluß von Heparin auf die Ultrafiltrabilität von ^{65}Zn aus Humanserum

Nach fraktionierter Abnahme der Ultrafiltrate von ^{65}Zn -markiertem Humanserum wurde nach Erreichen eines "steady state" durch Zugabe von 1000 I.E. Heparin zum Filtranden der Aktivitätsquotient von ^{65}Zn deutlich gesteigert. Dabei blieb sowohl der pH-Wert im Filtranden, als auch der Proteinanteil im Ultrafiltrat unverändert. Der Verdünnungsfehler bei der Zugabe von 0,2 ml Heparin zu 25 - 35 ml Filtrandenvolumen beträgt 0,6-0,8 % und konnte somit unberücksichtigt bleiben. Nach Zugabe von Heparin fand sich ein Anstieg von ^{65}Zn in den folgenden Fraktionen des Ultrafiltrates. In Abbildung 9 ist ein Einzelversuch dargestellt. Eine Übersicht der Versuche zur Frage des Einflusses von Heparin auf die Ultrafiltrabilität von ^{65}Zn zeigt Tabelle 5. Dabei ist die Aktivität im Ultrafiltrat als mittlere Aktivität während der Plateauphase sowie nach Heparin-Zugabe als Spitzenwert nach maximalem Anstieg angegeben. Der Proteingehalt im Ultrafiltrat ist als Absolutwert und prozentual zur Proteinkonzentration im verwendeten Humanserum angegeben.

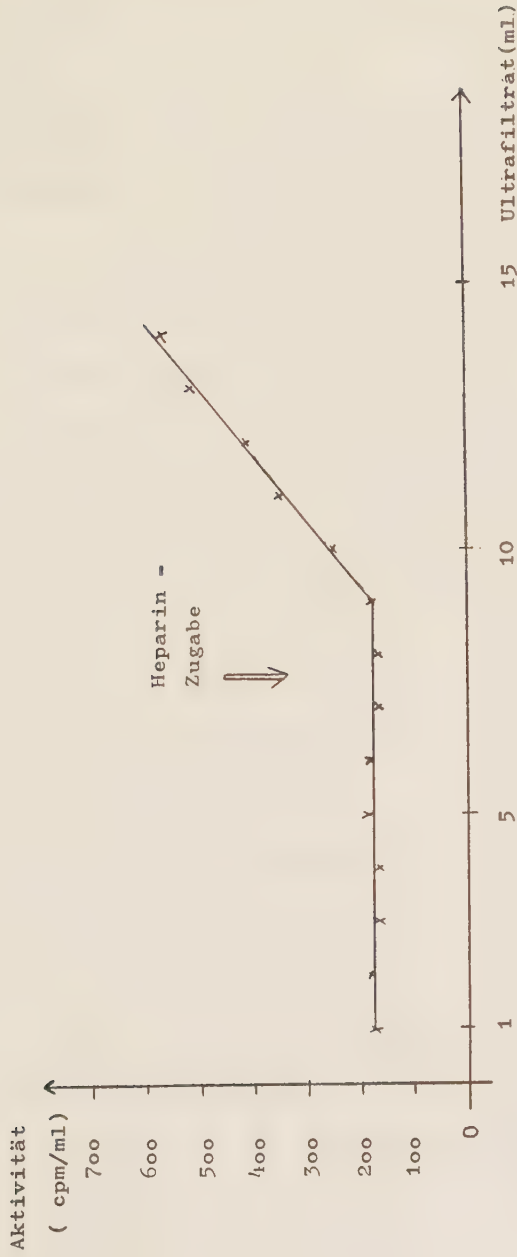


Abb.9 : Aktivitätsanstieg im Ultrafiltrat nach Heparin-Zugabe (1000 I.E.)
zum Filtranden

Tab. 5:

Einfluß von Heparin auf die Ultrafiltrabilität von ⁶⁵Zn-markiertem Humanserum

<u>Vor Heparin-Zugabe :</u>				<u>Nach Zugabe von 1000 I.E. Heparin :</u>			
Versuch	Aktivität im UF		Proteingehalt im UF	Aktivität im UF		Proteingehalt im UF	
	cpm/ml	%		(nach max. Anstieg) cpm/ml	%		
H	660	1,33	0,26	1510	3,1	0,27	0,39
I	170	0,35	0,21	952	2,0	0,33	0,25
K	560	1,40	0,20	1070	2,7	0,20	0,23
L	168	0,42	0,20	600	1,5	0,22	0,25

3.2 ^{65}Zn - und ^{125}I -Natriumiothalamat-Clearance

In zwei Versuchsgruppen mit je drei Ratten vom Stamm Sprague-Dawley (SD) und Wistar wurden die ^{65}Zn - und die ^{125}I - Natriumiothalamatclearance gleichzeitig bestimmt. Die Isotope wurden mittels Dauerinfusion zugeführt. Die Versuchsperioden betrugen 30 Minuten. Der Urin wurde während der Versuchsperioden seitengetreunt gesammelt und anschließend gemessen. Zur Bestimmung der Aktivität im Plasma wurde am Ende einer jeden Versuchsperiode Blut entnommen und nach sofortiger Zentrifugation die Aktivität im Plasma gemessen. Es wurden nur Clearance-Bestimmungen ausgewertet, die bei konstantem Plasmaspiegel der Isotope bestimmt wurden. In Tab. 6 sind 16 Clearanceperioden bei SD-Ratten zusammengestellt, die Clearancewerte sind jeweils auf eine Niere bezogen. Neben dem Urinzeitvolumen und den Plasmaspiegeln der Isotope sind die berechneten unkorrigierten Clearancewerte für ^{65}Zn und ^{125}I -Natriumiothalamat angegeben. Die mittlere ^{65}Zn -Clearance betrug $2,15 \mu\text{l}$ pro Minute, bezogen auf 100g Rattengewicht, für ^{125}I -Natriumiothalamat betrug sie $250 \mu\text{l}$. Aus den Clearance-Daten wurde ein mittlerer unkorrigierter Clearance-Quotient (vgl. S. 18) von $0,9\%$ berechnet. In Tab. 7 sind die entsprechenden Daten für die Untersuchungen an Wistar-Ratten zusammengestellt. Der mittlere unkorrigierte Clearance-Quotient betrug $0,6\%$. Ein Einfluß der Größe des Urinzeitvolumens auf

die Clearance war in unseren Versuchen nicht festzustellen, wie auch die ^{65}Zn -Plasmakonzentration keinen Einfluß auf die ^{65}Zn -Clearance hatte.

Abb.10 zeigt die Gegenüberstellung der korrigierten ^{65}Zn -Clearance-Mittelwerte, die sich unter Berücksichtigung der mittleren ^{65}Zn -Konzentration im Ultrafiltrat von 0,61 % der Gesamtkonzentration im Plasma errechneten (vgl.Forts.Tab.6+7). Es ergibt sich bei nahezu gleicher glomerulärer Filtrationsrate (^{125}I -Clearance) für SD-Ratten eine höhere ^{65}Zn -Clearance als für Wistar-Ratten. Entsprechend unterscheiden sich die aufgrund der korrigierten ^{65}Zn -Clearance-Werte berechneten mittleren Clearance-Quotienten. Sie betragen für SD-Ratten 1,47 und für Wistar-Ratten 0,95.

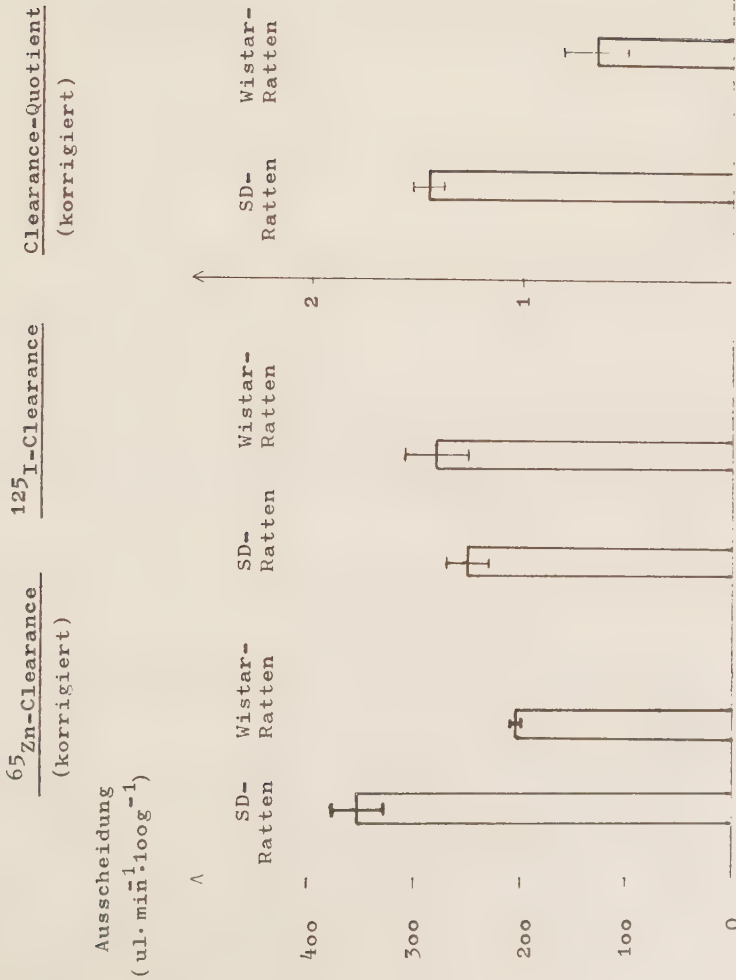


Abb.10: Gegenüberstellung von korrigierter ^{65}Zn -Clearance, ^{125}I -Na-Iothalamat-Clearance und korrigierten Clearance-Quotienten der beiden Versuchsgruppen

Tab.6 : ^{65}Zn -Clearance und ^{125}I -Natriumiothalamat-Clearance bei SD -Ratten

Nr.	$\dot{V}_u$ $\frac{\text{ml}}{30\text{min}}$	^{65}Zn -Plasmakonz.	^{65}Zn -Clearance	^{125}I -Plasmakonz.	^{125}I -Clearance	Clearance- Quotient $^{65}\text{Zn}/^{125}\text{I}$
		cpm/100 μl	$\mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 100\text{g}^{-1}$	cpm/100 μl	$\mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 100\text{g}^{-1}$	
1	0,34	445	3,42	47	290	0,012
2	0,20	428	3,04	48	280	0,011
3	0,29	445	3,01	47	250	0,012
4	0,17	428	2,55	48	230	0,011
5	0,31	692	1,50	55	170	0,009
6	0,25	639	1,60	63	170	0,009
7	0,20	637	1,70	56	190	0,009
8	0,31	692	1,50	55	170	0,009
9	0,26	639	1,70	63	180	0,009
10	0,20	637	1,70	56	180	0,009
11	0,19	632	2,00	154	240	0,008
12	0,24	620	1,90	147	310	0,006
13	0,27	612	2,00	148	320	0,006
14	0,18	632	1,90	154	260	0,007
15	0,30	620	2,60	147	370	0,007
16	0,32	612	2,30	148	310	0,007
$\bar{x} \pm \text{SE} : 0,25 \pm 0,01$			*		$245,0 \pm 16,0$	$0,009 \pm 0,0005$

* unkorrigiert für Plasmaproteinbindung

Tab.6 (Fortsetzung):

Nr.	⁶⁵ Zn-Clearance μl·min ⁻¹ ·100g ⁻¹	Clearance-Quotient ⁶⁵ Zn / 125 I
1	560,66	1,933
2	498,36	1,780
<u>Ratte 1</u>	493,44	1,974
4	418,03	1,818
5	245,90	1,446
6	262,30	1,543
7	278,69	1,467
8	245,90	1,446
9	278,69	1,548
10	278,69	1,548
11	327,87	1,366
12	311,48	1,005
13	327,87	1,025
<u>Ratte 3</u>	311,48	1,198
15	426,22	1,152
16	377,05	1,216
X [±] SE :	352,66 ± 24,71	1,466 ± 0,076

* korrigiert für die mittlere Ultrafiltrabilität von Zink von 0,61%

Tab. 7: ^{65}Zn -Clearance und ^{125}I -Natriumiothalamat-Clearance bei Wistar-Ratten

	$\dot{V}_u$	^{65}Zn -Plasmakonz.	^{65}Zn -Clearance	^{125}I -Plasmakonz.	^{125}I -Clearance	Clearance- Quotient $^{65}\text{Zn}/^{125}\text{I}$
Nr.	$\frac{\text{ml}}{30 \cdot \text{min}}$	cpm/100 μl	$\mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 100\text{g}^{-1}$	cpm/100 μl	$\mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 100\text{g}^{-1}$	
<u>Ratte 1</u>	1 0,40	563	1,35	218	120	0,011
	2 0,43	476	1,39	210	120	0,012
	3 0,42	563	1,73	218	160	0,011
	4 0,46	476	1,69	210	170	0,010
<u>Ratte 2</u>	5 0,08	427	1,15	119	290	0,004
	6 0,08	434	1,22	119	330	0,004
	7 0,09	427	1,51	119	380	0,004
	8 0,07	434	1,34	119	350	0,004
<u>Ratte 3</u>	9 0,25	476	0,87	101	300	0,003
	10 0,23	508	0,74	101	340	0,002
	11 0,24	476	0,99	101	340	0,003
	12 0,24	508	0,89	101	420	0,002
$\bar{x} \pm \text{SE}$	$0,25 \pm 0,04$		* $1,24 \pm 0,09$		$276,6 \pm 30,4$	$0,006 \pm 0,001$

* unkorrigiert für Plasmaproteinbindung

Tab.7 (Fortsetzung) :

	Nr.	* 65Zn-Clearance		* Clearance-Quotient	
		ul min ⁻¹	100g ⁻¹	65Zn /	125I
<u>Ratte 1</u>	1	221,31		1,844	
	2	227,87		1,899	
	3	283,60		1,773	
	4	277,05		1,630	
<u>Ratte 2</u>	5	188,52		0,650	
	6	200,00		0,606	
	7	247,54		0,651	
	8	219,67		0,628	
<u>Ratte 3</u>	9	142,62		0,475	
	10	121,31		0,357	
	11	162,30		0,477	
	12	145,90		0,347	
X ±SE	:	203,14±	15,24	0,945±	0,183

* korrigiert für die mittlere Ultrafiltrabilität von Zink von 0,61%

4.0 Diskussion

Es wurden als Grundlage dieser Arbeit drei Versuchsreihen mit folgendem Ergebnis durchgeführt:

Erstens: Die Ultrafiltration wässriger ^{65}Zn -Lösungen durch Ultrafiltrationsmembranen aus synthetischen Polymeren erweist eine Bindung von ^{65}Zn an die Membran. Die Dekontamination der Membran gelingt nur in sehr geringem Maße durch die Spülung und Filtration von Wasser, eine vollständige Dekontamination der Membran gelingt hingegen erst durch die Filtration wässriger Heparinlösungen und nachfolgender Filtration von unmarkiertem Serum.

Zweitens: Die Ultrafiltration von ^{65}Zn -markiertem Humanserum zeigt einen ultrafiltrablen Zink-Anteil von 0,25 - 1,4 %. Durch Zugabe von Heparin zum Filtranden läßt sich die Ultrafiltrabilität von ^{65}Zn steigern.

Drittens: Die Bestimmung der ^{65}Zn -Clearance bei Ratten wurde simultan mit der Bestimmung der ^{125}I -Natriumiothalamat-Clearance durchgeführt. Die unkorrigierte ^{65}Zn -Clearance war gering und betrug im Verhältnis zur ^{125}I -Natriumiothalamat-Clearance weniger als 1%. Unter Berücksichtigung des mittleren ultrafiltrablen Zink-Anteils von 0,61% der Gesamtkonzentration im Plasma, läßt sich ein korrigierter Clearance-Quotient von 1,47 für SD-Ratten und 0,95 für Wistar-Ratten errechnen.

4.1 Diskussion der Ultrafiltrationsversuche

4.1.1 Diskussion der Ultrafiltrationsmethoden

Die von uns verwendete und zugleich am weitesten verbreitete Methode ist die Ultrafiltration durch eine proteindichte Membran. Im Prinzip wird dabei der Filtrand entweder durch Druck, Sog oder im Schwerfeld einer Zentrifuge durch eine eiweiß- undurchlässige Membran filtriert. Wir verwendeten eine Membran aus synthetischen Polymeren. Daneben sind Membranen aus Collodium, Cellophan oder Cellulosenitrat gebräuchlich. Wir arbeiteten sowohl mit einer gerührten Zelle, bei der die Filtrationsarbeit durch Luftdruck (CO_2 - Luft- Gemisch) geleistet wurde, als auch mit der Zentrifugen-Ultrafiltrationsmethode. Es handelt sich um marktübliche Ultrafiltrationsgeräte der Firma Amicon, die den Vorteil einer sehr einfachen Handhabung bieten. Die technische Kontrolle eines einwandfreien Filtrationsablaufes erfolgte anhand der Bestimmung der Proteinkonzentration im Ultrafiltrat. Der mittlere Proteinanteil im Ultrafiltrat betrug 0,28% der Proteinkonzentration des Filtranden. Die von uns verwendete Ultrafiltrationstechnik bietet nicht die Möglichkeit, die CO_2 -Konzentration des Filtranden und damit den pH-Wert konstant zu halten. Die Methode der anaeroben Ultrafiltration, mit der z.B. CO_2 -Verluste fast vollständig vermieden werden können, ist in neuerer Zeit für die Ultrafiltration von Calcium beschrieben worden (43). Ein pH-Anstieg

durch CO_2 -Verluste des Filtranden ist jedoch nach unseren Untersuchungen sowie nach Mertz et al. bei der Ultrafiltrabilität von Zink ohne Bedeutung (36). Wie von Pedersen (44) am Beispiel des ultrafiltrablen Calcium -Anteils im einzelnen ausgeführt und gemessen, ist bei der Ultrafiltration ein Hemmeffekt auf den Durchtritt von Kationen durch die Ultrafiltrationsmembran durch die Proteinkonzentration des Filtranden zu erwarten (" Donnan-ähnlicher Faktor"). Diesen konnten wir wegen der hohen Proteinbindung und der geringen Menge des ultrafiltrablen Zinks nicht experimentell bestimmen. Es ist anzunehmen, daß sich die experimentellen Verhältnisse in vitro nicht prinzipiell von denjenigen bei der Ultrafiltration von Zink aus dem Serum durch die glomeruläre Membran in die Bowman'sche Kapsel unterscheiden.

4.1.2 Verwendung des Radioisotops ^{65}Zn

Neben der sehr zeitaufwendigen Methode der kolorimetrischen Zink-Bestimmung mit der Dithizone-Methode (Lit. bei 13), die vor etwa 20 Jahren Verwendung fand, eignen sich heute zwei Methoden zur raschen und genauen Messung von Zink im Serum und Urin: die Atomabsorptionsspektrophotometrie (AAS) und die Verwendung radioaktiver Isotope. Für die Zink -Bestimmung mit der AAS sind größere Probenvolumina erforderlich, als sie im Rattenversuch bei der Bestimmung der Zink-Clearance zur Verfügung stehen. Die Möglichkeit einer sehr exakten Bestimmung auch in sehr geringen Probenvolumina bietet der von uns verwendete Zinknachweis mit Hilfe des Radioisotops ^{65}Zn . Die Verwendung

einer trägerfreien Isotopenlösung ermöglichte darüber hinaus eine Meßmöglichkeit ohne Veränderung der physiologischen Zink-Konzentrationen in den Serum- und Urinproben.

Vom Element Zink existieren drei Radioisotope : ^{63}Zn , ^{65}Zn und $^{69\text{m}}\text{Zn}$. Dabei ist ^{63}Zn aufgrund der zu geringen Halbwertszeit von 38 Minuten für Clearance-Untersuchungen nicht geeignet. ^{65}Zn ist wegen seiner erheblich größeren Stabilität durch die Halbwertszeit von 245 Tagen das am häufigsten verwendete Zinkisotop. Es handelt sich um einen β - und γ -Strahler mit einer spezifischen Energie von 100 keV (β) und 1120 keV (γ). Dies bedeutet, daß ^{65}Zn als sehr harter Gammastrahler auch in geringsten Konzentrationen ein gut meßbarer Marker ist. Wir erwarben dieses Radioisotop als trägerfreie Zinkchloridlösung in 0,5 m Salzsäure. Wenige Autoren verwendeten auch das Isotop $^{69\text{m}}\text{Zn}$ bei Untersuchungen an Menschen , da die Verwendung von $^{69\text{m}}\text{Zn}$ eine geringere Strahlenbelastung durch die geringere spezifische Energie von 0,439 keV und eine kürzere Halbwertszeit von 13,6 Stunden mit sich bringt (1 , 17). Die Freigrenze für den Umgang mit ^{65}Zn in unserem Labor beträgt 10 μCi (Anlage 1 zur 1.Strahlenschutzverordnung über den Schutz vor Schäden durch Ionisierende Strahlen vom 13.10.1976). Unter strenger Einhaltung der Freigrenze konnten die Ultrafiltrationsversuche wie auch die Clearance-Versuche in unserem Labor durchgeführt werden. Der Umgang mit dem Isotop erforderte besondere Vorsichtsmaßnahmen. Die radio -

aktiven Lösungen wurden in Bleibehältern aufbewahrt. Während der Versuche waren alle Arbeitsflächen mit gummiertem Spezialpapier abgedeckt, um sie vor einer Kontamination mit Radioaktivitätsresten zu schützen. Zudem wurden regelmäßige Kontrollen der Arbeitsplätze mit einem Geigerzähler durchgeführt. Sämtliche flüssigen Isotopenabfälle wurden in einem besonderen Gefäß für ^{65}Zn -Lösungen in das Nuklearmedizinische Institut des Klinikums Steglitz gebracht.

Es sei an dieser Stelle ausdrücklich darauf hingewiesen, daß wir uns sowohl bei den Pilotexperimenten, als auch bei den biologischen Versuchen aufgrund der Strahlenbelastung auf die zur Klärung unbedingt notwendige Anzahl an Versuchen beschränkt haben. Das Radioisotop ^{65}Zn wurde vielfach für Untersuchungen verwendet, die der Aufklärung des Zink-Stoffwechsels dienten. Die Verteilung von Zink im Gewebe verschiedener Organe, vor allem bei Hunden, Ratten und Mäusen ist mit Hilfe von ^{65}Zn untersucht worden (12, 33, 40, 53). Einzelne Versuche sind auch an Patienten mit ^{65}Zn durchgeführt worden. Die Messung der Aktivität erfolgte dabei mit Hilfe der Ganzkörperszintillationszählung (57). Foster et al. untersuchten den Zink-Metabolismus beim Menschen nach oraler wie parenteraler Gabe von $^{69\text{m}}\text{Zn}$ (1, 17).

4.1.3 Diskussion der Versuchsergebnisse zu 3.1.1

In den Versuchen zur Ultrafiltrabilität wässriger ^{65}Zn -Lösungen konnte die erwartete 100%ige Wieder-

entdeckung von ^{65}Zn im Ultrafiltrat nicht festgestellt werden (vgl.Tab.1+2). Dies steht im Widerspruch zu den Untersuchungen von Prasad und Oberleas (49), die eine Wiederentdeckung von Zink im Ultrafiltrat von 98 -100 % angeben. Bei der fraktionierten Filtration einer wässrigen ^{65}Zn -Lösung stieg die Aktivität im Filtrat von 52,4% auf 92,9% im Sinne einer "Membransättigung" an (vgl.Abb.7). Die Messung des Überstandes ergab eine gegenüber der Ausgangsaktivität im Filtranden erhöhte Aktivität. Die mehrfache Filtration einer wässrigen ^{65}Zn -Lösung durch eine Membran ergab beim ersten Filtrationsvorgang eine Recovery von 49,7%. Bis zur vierten Filtration stieg die Recovery auf 97,8 % an, d.h. die Membran ist beim vierten Filtrationsdurchlauf vollständig "beladen". Die Aktivität im Überstand war geringer als die Ausgangsaktivität. Sie betrug 98,6 - 88 %, dies spricht für ein Übertreten von ^{65}Zn aus dem Überstand in die Membran. Zum Nachweis von ^{65}Zn -Membran-Interaktionen wurde die Ultrafiltrationsapparatur nach jedem Filtrationsvorgang in die Einzelteile zerlegt und die durch Abspülen erhaltene Restaktivität von den Geräteteilen und der Membran gemessen. Dabei zeigte sich, daß nur ein völlig unbedeutender Teil der Restaktivität als "Verschmutzung" an den Geräteteilen verblieben war. Die nach erneutem Zusammenbau des Gerätes durchgeführte Filtration von destilliertem Wasser erbrachte nur eine geringe Aktivität im Filtrat (vgl.Tab.3). Durch die Filtration einer wäss-

rigen Heparin-Lösung wurde deutlich mehr ^{65}Zn aus der Membran freigespült (vgl. Abb. 7). Die anschließende Ultrafiltration von unmarkiertem Serum führte zu einem deutlichen Anstieg der Aktivität im Ultrafiltrat (vgl. Abb. 7). Dabei ist bemerkenswert, daß die Membran zuvor niemals mit Proteinen in Berührung gekommen war. Die Bindung von Zink an ultrafiltrable Aminosäuren ist besonders von Prasad und Oberleas untersucht worden (49).

4.1.4 Diskussion der Versuchsergebnisse zu 3.1.2

In unseren Versuchen zur Bestimmung der Ultrafiltrabilität von ^{65}Zn -markiertem Humanserum sollte der nicht an Serumproteine gebundene Anteil von Zink gemessen werden. Wir fanden im Bereich physiologischer Zink-Konzentrationen eine ultrafiltrable Serum-Zink-Fraktion von 0,61 % (0,29-1,40%). Sie setzt sich zusammen aus dem geringen Anteil an ionisiertem Zink und dem an Aminosäuren gebundenen Teil. Einige Autoren haben die Zink-Bindungsfähigkeit von Aminosäuren näher untersucht (20, 49). Sie verwendeten dazu prädialysiertes Serum und fügten Aminosäuren in unterschiedlichen Konzentrationen zu. Besondere Bindungsfähigkeit für Zink besitzen danach die Aminosäuren Histidin, Zystin, Threonin und Glutamin. Prasad und Oberleas konnten zeigen, daß sich die Ultrafiltrabilität von Zink durch Zugabe von Aminosäuren steigern läßt (49). Auch Giroux und Henkin untersuchten, in welcher Weise bestimmte Aminosäuren um die Protein-Zink-Bindung konkurrieren können (20). Mit der Bindung an Ami-

nosäuren gelangt Zink ins Ultrafiltrat bzw. in die Tubulusflüssigkeit. Die ultrafiltrable Zinkfraktion im nativen Serum wird von Prasad und Oberleas mit 2-8% angegeben(49). Dies entspricht größenordnungsmäßig der Menge des an Aminosäuren gebundenen Zinks.

Im Serum ist Zink zum größten Teil an Serumproteine gebunden und damit nicht ultrafiltrabel. Man kann dabei eine feste Bindung an Globuline von einer lockeren Bindung an Albumin unterscheiden. Unter den Globulinen ist besonders für die alpha-Globuline Coeruloplasmin und alpha-2-Makroglobulin eine besonders feste Zinkbindung nachgewiesen worden(40,41,49). Der größere Anteil, etwa 60-70% des an Serumproteine gebundenen Zinks, ist locker gebundenes Zink, komplexgebunden an Albumin. Nach der oralen Zugabe oder der Injektion von radioaktivem Zink findet vor allem mit dieser locker gebundenen Fraktion ein Austausch statt(20, 49).

Unsere Untersuchungen über den Einfluß von pH-Änderungen des Filtranden auf die Ultrafiltrabilität von Zink ergaben im Bereich von pH 7,35-7,95 keine signifikante Änderung der Ultrafiltrabilität. Prasad und Oberleas verweisen hingegen in ihren 1966 durchgeführten Untersuchungen auf eine Zunahme des ultrafiltrablen Zinks bei sinkendem pH-Wert des Filtranden (49). Hingegen kommen Mertz et al. 1979 zu der Feststellung, daß die Ausscheidung von Zink mit dem Harn vom pH-Wert unabhängig zu sein scheint (36). Wir verwendeten für unsere Untersuchungen

frisch gewonnenes Humanserum ohne jeglichen Zusatz gerinnungshemmender Substanzen.

Der Einfluß von Heparin auf die Ultrafiltrabilität von ^{65}Zn (vgl. Abb. 9) ist deutlich auch bei Zugabe sehr geringer Heparin-Mengen. Schon 0,2 ml Heparin (1000 I.E.) auf 30 ml Humanserum führte zu einem Anstieg von Zink im Ultrafiltrat um bis zu 500%. Das von uns verwendete Heparin besteht aus Glucosamin-N-Schwefelsäure und Schwefelsäure-Estern, die durch glykosidische Bindung miteinander verknüpft sind. Hierdurch entsteht die wasserlösliche Polysaccharidkette, die durch vielfache Veresterung mit Schwefelsäure elektronegativ ist. Da die Steigerung der Ultrafiltrabilität durch Heparin auch in wässrigen Lösungen nachgewiesen wurde (vgl. Abb. 7), scheint eine Bindung von Zink an das Polyanion Heparin ursächlich zu sein. Untersuchungen von Rose und Willden (52), die bei der Ultrafiltration von Serum gesunder Versuchspersonen eine ultrafiltrable Zink-Fraktion von 60% erhielten, sind vermutlich darauf zurückzuführen, daß sie die verwendeten Blutproben durch Zugabe von Heparin ungerinnbar gemacht hatten. Deutliche Unterschiede zwischen der Zink-Konzentration von Serum und Plasma waren zuvor schon von Halsted et al. (25) beobachtet und mit dem hohen Zink-Gehalt der Blutplättchen erklärt worden.

4.2 Diskussion der Clearance-Versuche

4.2.1 Zur Methodik der Clearance-Bestimmungen

Die Untersuchung der ^{65}Zn -Clearance wurde erstmals von Rubini et al. veröffentlicht (53). Die Autoren

untersuchten die renale Ausscheidung einer durch einmalige Injektion von ^{65}Zn zugeführten Dosis an zwei Hunden. Das intravenös injizierte ^{65}Zn wurde rasch aus dem Plasma in die verschiedenen Organe aufgenommen, daher mußte bei fallendem Plasmaspiegel gearbeitet werden. Es ergaben sich unterschiedliche Werte für den Quotienten aus ^{65}Zn - Clearance und der simultan bestimmten Inulin-Clearance, die zur Feststellung der glomerulären Filtrationsrate diente. Der Clearance-Quotient ($C_{\text{Zn}} / C_{\text{Inulin}}$) betrug zu Beginn der Versuchsperiode 0,4 und stieg mit fallendem Plasmaspiegel an. Am Ende der Beobachtungszeit von mehr als fünf Stunden betrug der Clearance-Quotient 4,0. Dies interpretierten die Autoren als Indiz für eine tubuläre Sekretion von Zink. Die Interpretation dieser Versuchsergebnisse erscheint uns fraglich, da die Clearance-Bestimmung bei fallendem Plasmaspiegel fehlerhaft ist und außerdem eine veränderte Nierenfunktion nach über fünfstündiger Versuchszeit nicht auszuschließen ist. Vor allem aber wurde bei der Berechnung der Clearance-Quotienten die hohe Plasmaproteinbindung von Zink nicht berücksichtigt. Das Verhalten von ^{65}Zn nach der einfachen intravenösen Injektion ist von verschiedenen Autoren untersucht worden. Prasad et al. untersuchten Patienten, denen ^{65}Zn als einmalige Dosis intravenös verabreicht wurde (50). Nach 30 Minuten fanden sich im Plasma 1,24% der Ausgangsaktivität, nach einer Stunde waren es nur noch 0,76%. Dies macht erneut deutlich, daß Untersuchungen der ^{65}Zn -Clearance beim Menschen äußerst schwierig sind. Okunewick et

al. haben das Verhalten von ^{65}Zn im Rattenplasma untersucht(40). Sie stellten fest, daß nach intra-venöser Gabe die Gesamtmenge des Isotops für etwa 60 Minuten in locker gebundener Form im Plasma verbleibt. Die Ratte scheint daher ein geeignetes Versuchstier für die Bestimmung der ^{65}Zn -Clearance zu sein.

Die Aufnahme von Zink aus dem Plasma erfolgt sowohl in die Knochen als auch in weiche Gewebe wie Leber, Milz, Niere, Pankreas, Herz und Muskulatur (5, 6, 17, 37, 53). Zwischen diesen Geweben und der locker an Albumin und Aminosäuren gebundenen Zink-Fraktion findet ein Austausch statt (19, 20).

In unseren Versuchen wurden die Isotopenlösungen mit ^{65}Zn und ^{125}I -Na-Iothalamat als Dauerinfusion verabreicht. Durch die Gabe einer geeigneten Primärdosis wurde der Plasmaspiegel schnell erreicht. Es wurden nur Versuchsperioden ausgewertet, die bei konstantem Plasmaspiegel bestimmt wurden. Nach den Urinsammelperioden von je 30 Minuten wurde aus der A. carotis Blut entnommen und sogleich zentrifugiert. Die Aktivität wurde in je 100 μl Serum gemessen. Die gleichzeitige Bestimmung der ^{125}I -Na-Iothalamat-Clearance diente als Referenz der glomerulären Filtrationsrate (vgl. 4.2.2).

4.2.2 Verwendung von ^{125}I -Na-Iothalamat als Referenz für die glomeruläre Filtration

Als Referenzsubstanz bei der Bestimmung der ^{65}Zn -Clearance kann die ^{125}I -Na-Iothalamat-Clearance wie die Inulin-Clearance zur Bestimmung der glo-

merulären Filtrationsrate verwendet werden.

^{125}I -Na-Iothalamat bietet in unseren Versuchen gegenüber Inulin den Vorteil, daß es als reiner Gammastrahler mit ^{65}Zn in einer Probe gleichzeitig gemessen werden kann, während Inulin lediglich als Betastrahler mit ^{14}C oder ^3H markiert erhältlich ist. Die gleichzeitige Zählung von ^{65}Zn und ^{125}I in einem 2-Kanal-Gammazähler war aufgrund der unterschiedlichen Energiebereiche beider Nuklide möglich (vgl. 2.2.5). In der Literatur sind verschiedene Arbeiten über Natriumiothalamat erschienen, die es als geeignete Substanz zur Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) ausweisen (7,9,54). Die Iothalamat-Clearance bei der Ratte wies eine hohe Korrelation mit der Inulin-Clearance auf, wobei in den Versuchen eine Einzeldosis ^{131}I -Na-Iothalamat injiziert wurde und die Messung durch extrakorporale Gammazählung erfolgte (7). Von Bedeutung für die Verwendung von Na-Iothalamat ist die Feststellung von Blaufox et al., daß keine signifikante Bindung von Iothalamat an Proteine stattfindet, die sich auf die Ultrafiltrabilität auswirken würde (7). Clearance-Bestimmungen beim Menschen haben für Inulin und Iothalamat eine hohe Korrelation ergeben. Bei diesen Untersuchungen wurden die Substanzen als Dauerinfusion bei konstantem Plasmaspiegel gegeben (9,54). Auch zur Standard-Kreatinin-Clearance besteht eine hohe Korrelation. Die Iothalamat-Clearance wurde mit Hilfe der single-injection-Technik und extrakorporaler Gammazählung gemessen. (9). Unterschiede in den

Clearanceraten von Iothalamat und Kreatinin wurden beim Menschen nur im Bereich sehr stark ermäßigter Filtrationsraten (unter 10 ml/min) gefunden(9). Einheitlich gilt heute Iothalamat unter physiologischen Bedingungen als geeignete Substanz zur Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate.

4.2.3 Diskussion der Versuchsergebnisse zu 3.2

In den Clearance-Versuchen wurden die Klärwerte für ^{65}Zn und $^{125}\text{I-Na-Iothalamat}$ nach der Clearance-Formel berechnet(vgl.unter 2.2.4). Wir fanden eine mittlere $^{125}\text{I-Na-Iothalamat}$ -Clearance bei SD-Ratten von $0,25 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$, bei Wistar-Ratten betrug sie $0,28 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$. Blaufox und Cohen stellten eine mittlere $^{131}\text{I-Na-Iothalamat}$ -Clearance von $0,46 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ fest,verwendeten jedoch Ratten eines anderen Stammes und eine andere Meßtechnik (single-injection-Technik bei extrakorporaler Gammazählung) (7).

Aus unseren Versuchen ergibt sich ein mittlerer Clearance-Quotient für die unkorrigierte ^{65}Zn -Clearance und $^{125}\text{I-Na-Iothalamat}$ -Clearance von 0,9 bei SD-Ratten und 0,6 bei Wistar-Ratten. Die Zink-Clearance ist offensichtlich nicht abhängig vom Urinzeitvolumen (vgl. Tab.6 + 7), wie dies auch von anderen Autoren festgestellt wurde (36,61). Untersuchungen der Zink-Ausscheidung in Abhängigkeit vom Diuresezustand von Patienten ergaben, daß die renale Zink - Ausscheidung

weitgehend unabhängig vom Diuresezustand ist. Unter der Wirkung einer osmotischen Diurese mit hypertoner Mannitlösung, durch isotone Kochsalzlösung oder durch Saluretika bedingt, kam es zu einer geringen Steigerung der Zinkausscheidung (36,59,63). Im Gegensatz dazu fanden Abu Hamdan et al.(2) bei der Untersuchung an 13 narkotisierten Hunden keinen Einfluß von Mannit auf die Ausscheidung von Zink. Eine Zunahme der absoluten renalen Zinkausscheidung konnte jedoch durch eine Zinkinfusion bewirkt werden. Mertz et al.(36) konnten in ihren Untersuchungen feststellen, daß die renale Zinkausscheidung durch Änderung der nierenhämodynamischen Meßgrößen kaum zu beeinflussen ist. So konnte gezeigt werden, daß auch eine Einschränkung der Inulin-Clearance beim Menschen auf Werte unter 30 ml/min und eine Herabsetzung der PAH-Clearance auf weniger als 200 ml/min als Meßgrößen der glomerulären Filtration und des renalen Plasmaflusses, ohne Einfluß auf die Ausscheidung von Zink durch die Niere ist.

Bei Patienten mit Stoffwechselerkrankungen, vor allem bei Patienten mit Nephrotischem Syndrom, kann eine erhöhte Zinkausscheidung über die glomeruläre Basalmembran auftreten. Dabei ist die auftretende Albuminurie mit einer signifikanten Steigerung der renalen Zinkausscheidung verbunden(3,8,47,55). Als Grund dafür wurde der Verlust von Zink-Protein-Komplexen über die Basalmembran

angesehen. Eine direkte Korrelation der Hyperzinkurie mit dem Ausmaß der Albuminurie konnte jedoch nicht hergestellt werden (41,61).

4.2.4 Der tubuläre Transport von Zink

Zur Untersuchung von Sekretions- und Reabsorptionsvorgängen wurden durch verschiedene Arbeitsgruppen Versuche mit der "stop-flow-Technik" durchgeführt (2,62). Dabei wird durch Abklemmen des Ureters der Urinabstrom gestoppt und damit der intratubuläre Druck erhöht. Dadurch kommt es praktisch zum Sistieren der glomerulären Filtration. Während der tubuläre Flüssigkeitsabstrom weitgehend blockiert ist, finden jedoch transtubuläre Transportvorgänge statt. Die fraktionierte Entnahme der aufgestauten Flüssigkeitssäule im Tubulus nach Öffnung der Ureterklemme, ermöglicht sodann eine grobquantitative Aussage über tubuläre Transportvorgänge anhand der unterschiedlichen Ionenzusammensetzungen der einzelnen Fraktionen. Bei hinreichend sorgfältiger Sammlung kleinster Fraktionen kann eine vorsichtige Zuordnung der Transportvorgänge zu den Segmenten des Nephrons vorgenommen werden. Abu Hamdan et al. (2) führten stop-flow-Versuche an Hunden durch, um Aussagen über die Lokalisation tubulärer Zinktransportprozesse machen zu können. Sie untersuchten die renale Zinkausscheidung nach Infusion von Zinklösungen und Aminosäurelösungen, vor allem mit Cystein und Histidin. Als Meßmethode diente die Atomabsorptionsspektrophotometrie. Durch die Infusion der

Zinklösungen ließ sich die renale Ausscheidung von Zink steigern, während das Verhältnis von Zink-Clearance zu Inulin-Clearance abfiel; ein völlig unerwarteter Befund. Die Autoren schlossen daraus auf eine tubuläre Resorption von Zink. Mit Hilfe der stop-flow-Untersuchungen konnte die Resorption dem distalen Abschnitt des Nephrons zugeordnet werden. Nach Infusion einer Cystin-Lösung stieg die absolute Zinkausscheidung an. Aus dem Clearance-Quotienten von Zink und Inulin konnte auf eine tubuläre Sekretion geschlossen werden, die nach den Ergebnissen der stop-flow-Untersuchungen dem proximalen Konvolut zugeordnet wurden. Weitere Versuche über Sekretions- und Reabsorptionsvorgänge von Zink wurden von Victory et al. (62) veröffentlicht. Unter Mannitdiurese wurde an narkotisierten Hunden gleichfalls mit der stop-flow-Technik gearbeitet. Auch hier wurde bei einer sehr geringen Zinkausscheidung eine Nettoresorption im distalen Tubulus vermutet. Außerdem fanden die Autoren eine Nettosekretion im proximalen Tubulus und bei Gabe von Chlorothiazid eine Sekretion im spätdistalen Konvolut.

Neuere Untersuchungen über tubuläre Transportvorgänge von Zink, die parallel zu den in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen durchgeführt wurden, sind in einer Promotionsarbeit von E. Bock veröffentlicht (" Ausscheidung von Zink durch die Ratteniere in Mikroperfusionsexperimenten und unter dem Einfluß von Diuretika " , Inaugural-Dissertation, 1982).

In Mikropunktionsuntersuchungen wurde das Verhalten von ^{65}Zn im Nierentubulus von Ratten untersucht. Dabei wird ein bestimmtes Flüssigkeitsvolumen intratubulär infundiert und stromabwärts aus demselben Tubulus reaspiriert oder im Endurin gesammelt. Die Aktivitätsänderung auf dem Weg zwischen dem Ort der Infusion und der Reaspiration ließ auf die in diesem Nephronabschnitt stattfindenden Transportvorgänge schließen, jedenfalls auf die in dem untersuchten Segment vorhandenen, mit ^{65}Zn meßbaren unidirektionalen Fluxen. Als Ergebnis dieser Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß etwa 89% der mikroinfundierten Aktivität auf dem Weg von frühproximaler Infusion bis zum Endurin reabsorbiert werden. Nähere Untersuchungen ergaben einen Aktivitätsverlust von 40% im proximalen Konvolut, 70% Aktivitätsverlust in der Henle'schen Schleife und 25% Reabsorption im distalen Tubulus und im Sammelrohr.

Die Ergebnisse der o.g. Mikropunktionsuntersuchungen einer fast 90%-igen Zink-Resorption im Tubulus-Verlauf, sind mit den in der vorliegenden Arbeit dargestellten Befunden einer geringen Ultrafiltrabilität von Zink aufgrund ausgeprägter Bindung an Plasmaproteine und den Ergebnissen der um diese Ultrafiltrabilität korrigierten Clearance-Werte nur vereinbar, wenn man eine erhebliche Zink-Sekretion annimmt. Deren Lokalisation kann jedoch aus unseren Versuchen nicht abgelesen werden.

5.0 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur renalen Zinkausscheidung durchgeführt.

Dazu wurden erstens die Ultrafiltrabilität von Zink aus wässrigen Lösungen und aus ^{65}Zn -markiertem Humanserum in vitro untersucht. Es zeigte sich eine Interaktion von ^{65}Zn mit der verwendeten Membran derart, daß wässrige ^{65}Zn -Lösungen nicht zu 100% filtriert wurden. Die ultrafiltrable Fraktion von Zink im Humanserum betrug 0,29-1,4%, im Mittel 0,61%.

Zweitens: Die ultrafiltrable Zink-Fraktion im Serum konnte durch Heparin-Zugabe zum Filtranden deutlich gesteigert werden.

Drittens wurden ^{65}Zn -Clearance-Bestimmungen an nar-kotisierten Ratten zweier Stämme durchgeführt. Die gleichzeitige Bestimmung der Clearance von Natrium-iothalamat, als einer tubulär nicht transportablen Substanz, diente als Referenz für die glomeruläre Filtration. Unter Berücksichtigung der geringen Ultrafiltrabilität von Zink konnte eine hohe ^{65}Zn -Clearance berechnet werden, die im Verhältnis zur ^{125}I -Iothalamat-Clearance (korrigierter Clearance-Quotient) 1,47 für SD-Ratten und 0,95 für Wistar-Ratten betrug. Dies werteten wir als Hinweis auf eine tubuläre Sekretion von Zink. Die Zink-Ausscheidung war unabhängig vom Urinzeitvolumen und weitgehend unabhängig von anderen nierenhämodynamischen Meßgrößen.

Übersichtstabelle: 1

^{65}Zn -Lösungen unter Verwendung einer gerührten Zelle
mit einer Diaflo^R-Membran Typ PM10

^{65}Zn -Aktivität im	A	B	C	D	E	F	G
Filterand 1 (cpm/ml)	6557	12000	46200	7610	3770	5600	7380
Ultrafiltrat 1 (cpm/ml)	3437	7000	22150	4786	500	2780	5912
Ultrafiltrat 1 (%)	52,4	58,3	47,9	63,0	13,5	49,7	80,0
Überstand 1 (cpm/ml)	—	—	—	—	3250	5200	6613
Überstand 1 (%)	—	—	—	—	86,2	92,8	89,5
Filterand 2 (cpm/ml)	6557	12000	—	—	—	4012	6613
Ultrafiltrat 2 (cpm/ml)	5328	8300	—	—	—	3628	6172
Ultrafiltrat 2 (%)	81,2	70,8	—	—	—	90,0	93,3
Überstand 2 (cpm/ml)	—	—	—	—	—	3958	—
Überstand 2 (%)	—	—	—	—	—	98,6	—

Fortsetzung der Übersichtstabelle 1 :

⁶⁵ Zn-Aktivität im	A	B	C	D	E	F	G
Filtrand 3 (cpm/ml)	6557	12000	—	—	—	3764	—
Ultrafiltrat 3 (cpm/ml)	6100	9700	—	—	—	3100	—
Ultrafiltrat 3 (%)	92,9	80,8	—	—	—	82,0	—
Überstand 3 (cpm/ml)	7260	10000	—	—	—	3322	—
Überstand 3 (%)	110,7	83,0	—	—	—	88,0	—
Filtrand 4 (cpm/ml)	—	—	—	—	—	3402	—
Ultrafiltrat 4 (cpm/ml)	—	—	—	—	—	3326	—
Ultrafiltrat 4 (%)	—	—	—	—	—	97,8	—

Übersichtstabelle 2 :

Versuche zur Dekontamination einer mit ^{65}Zn beladenen Membran Diaflo^R PM 10

Restaktivität in der Membran (cpm)	Aktivität im Ultrafiltrat (cpm) nach Filtration von:			Aktivität im Serumüberstand
	H ₂ O	H ₂ O + 1000 I.E. Heparin	Humanserum	
41000	2500 (6,1%)	-----	26860 (65,5%)	11000 (26,8%)
65000	3000 (4,6%)	-----	43550 (67,0%)	15620 (24,0%)
424000	14920 (3,5%)	26850 (6,3%)	166850 (39,4%)	52500 (12,4%)
112900	16000 (14,2%)	-----	63500 (56,2%)	17600 (15,6%)
83660	13840 (16,5%)	-----	-----	-----

Übersichtstabelle 3:

Ultrafiltration von ^{65}Zn -markiertem Humanserum mit einer gerührten Zelle
unter Verwendung einer Diaflo^R-Membran PM 10

<u>Filtrand</u>			<u>Ultrafiltrat</u>			<u>Überstand</u>	
Aktivität (cpm/ml)	Proteingehalt (g/l)	pH	Aktivität (cpm/ml)	Proteingehalt (g/l)	pH	Aktivität (cpm/ml)	pH
40000	88,3	8,2	167,5 (0,42%)	0,20 (0,23%)	8,5	80215,7	8,56
40080	88,3	8,8	560 (1,4%)	0,20 (0,23%)	8,8	110910	8,8
49350	69,5	8,8	660 (1,33%)	0,26 (0,37%)	8,7	121930	8,8
48150	90,8	8,2	170 (0,35%)	0,21 (0,23%)	8,5	155865	8,5
33430	92,3	8,5	225 (0,66%)	0,20 (0,22%)	8,6	40161	8,6

Fortsetzung Übersichtstabelle 3:

Filtrand	Ultrafiltrat			Überstand	
	Aktivität (cpm/ml)	Proteingehalt (g/l)	pH	Aktivität (cpm/ml)	pH
34700		85,1	8,1		
				99,7 (0,29%)	0,22 (0,26%)
				8,4	8,3
39300		86,8	7,8		
				125,5 (0,30%)	0,31 (0,36%)
				7,8	7,7
31580		85,1	7,6		
				115 (0,36%)	0,24 (0,28%)
				7,7	7,7
33620		88,3	7,6		
				141 (0,42%)	0,30 (0,34%)
				7,8	7,8
$\bar{X} \pm SE :$				$0,61 \pm 0,15\%$	$0,28 \pm 0,02\%$

Übersichtstabelle 4:

Einfluß von Heparin auf die Ultrafiltrabilität von ⁶⁵Zn-markiertem Humanserum

a) Vor Heparin Zugabe:					b) Nach Zugabe von 1000 I.E. Heparin :				
Filtrand		Ultrafiltrat			Ultrafiltrat			Überstand	
Aktivität	Proteingehalt	Aktivität	Protein-		Aktivität	Proteingeh.		pH	
(cpm/ml)	(g/l)	(cpm/ml)	gehalt		(cpm/ml)	(g/l)	(%)	(g/l)	(%)
		(%)	(g/l)	(%)					
40000	88,3	8,2	167,5	0,42	600	0,22	1,5	0,25	8,3
40080	88,3	8,8	560	1,40	1070	0,20	2,7	0,23	8,8
49350	69,5	8,8	660	1,33	1510	0,27	3,1	0,39	8,8
48150	90,8	8,2	170	0,35	952	0,33	2,0	0,25	8,5

Übersichtstabelle 5 : ^{65}Zn -Clearance bei einer SD-Ratte (320g)

Periode	Urinfluß $\dot{V}_u$ ($\frac{\text{ml}}{30 \cdot \text{min}}$)	linke Niere		rechte Niere		^{65}Zn im Plasma (cpm/100µl)	^{65}Zn im Urin (cpm/100 µl)	^{65}Zn im Urin (U) ^{65}Zn im Plasma (P)		^{65}Zn -Clearance ($\mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 100 \text{g}^{-1}$)
		^{65}Zn im Plasma	^{65}Zn im Urin	^{65}Zn im Plasma	^{65}Zn im Urin					
T_0 (0-30')	0,47	478	316	---	---	---	---	---	---	---
T_1 (30-60')	0,29 0,34	445	459	1,00	0,97	3,01 $\cdot 10^{-3}$	3,42 $\cdot 10^{-3}$			
T_2 (60-90')	0,17 0,20	428	628	1,44	1,46	2,55 $\cdot 10^{-3}$	3,04 $\cdot 10^{-3}$			
T_3 (90-120')										
Wegen ansteigendem Plasmaspiegel wurde die Periode T_3 nicht ausgewertet.										
n = 2										
$\bar{x} \pm \text{SE} =$		450 $\pm$ 18		1,22 $\pm$ 0,22	1,18 $\pm$ 0,18			2,78 $\pm$ 0,23 10^{-3}		3,23 $\pm$ 0,15 $\cdot 10^{-3}$

Übersichtstabelle 5a: ^{125}I -Clearance bei einer SD-Ratte (320g)

Periode	Urinfluß $\dot{V}_u$ ($\frac{\text{ml}}{30 \cdot \text{min}}$)	linke Niere rechte Niere		$\frac{^{125}\text{I} \text{ im Urin (U)}}{^{125}\text{I} \text{ im Plasma (P)}}$	^{125}I -Clearance ($\mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 100 \text{g}^{-1}$)
		^{125}I im Plasma (cpm/100 μl)	^{125}I im Urin (cpm/100 μl)		
T_0 (0-30')	0,47 0,59	46	2384 2077	----- -----	----- -----
T_1 (30-60')	0,29 0,34	47	3786 3753	81,2 80,5	0,25 0,29
T_2 (60-90')	0,17 0,20	48	6070 6357	127,8 133,8	0,23 0,28
T_3 (90-120')	Bei ansteigendem Plasmaspiegel wurde die Periode T_3 nicht ausgewertet.				
$n = 2$					
$\bar{X} \pm \text{SE} =$		$47,0 \pm 0,7$		$104,5 \pm 23,3$ $107,2 \pm 26,7$	$0,24 \pm 0,01$ $0,29 \pm 0,05$

Übersichtstabelle 6 : ^{65}Zn -Clearance bei einer SD-Ratte (400g)

Periode	linke Niere		rechte Niere		$\frac{^{65}\text{Zn im Urin (U)}}{^{65}\text{Zn im Plasma (P)}}$	$^{65}\text{Zn-Clearance}$ ($\mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 100\text{g}^{-1}$)
	Urinfluß $\dot{V}_u$ ($\frac{\text{ml}}{30 \cdot \text{min}}$)	$^{65}\text{Zn im Plasma}$ (cpm/100 μl)	$^{65}\text{Zn im Urin}$ (cpm/100 μl)			
T_0 (0-30')	0,45 0,43	691	274 279	---	---	---
T_1 (30-60')	0,31 0,31	692	401 415	0,58	$1,50 \cdot 10^{-3}$	$1,50 \cdot 10^{-3}$
T_2 (60-90')	0,26 0,25	639	521 522	0,78	$1,70 \cdot 10^{-3}$	$1,60 \cdot 10^{-3}$
T_3 (90-120')	0,20 0,20	637	657 652	1,03	$1,70 \cdot 10^{-3}$	$1,70 \cdot 10^{-3}$
$n=3$						
$\bar{x} \pm \text{SE} =$		656 ± 18		$0,80 \pm 0,13$ $0,80 \pm 0,12$	$1,63 \pm 0,07 \cdot 10^{-3}$	$1,60 \pm 0,06 \cdot 10^{-3}$

Übersichtstabelle 6a: ^{125}I - Clearance bei einer SD-Ratte (400g)

Periode	linke Niere		rechte Niere		$\frac{^{125}\text{I im Urin (U)}}{^{125}\text{I im Plasma (P)}}$	$^{125}\text{I} \text{ - Clearance}$ ($\mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 100\text{g}^{-1}$)
	Urinfluß $\frac{V_u}{30 \cdot \text{min}}$ ($\frac{\text{ml}}{30 \cdot \text{min}}$)	^{125}I im Plasma (cpm/100 μl)	^{125}I im Urin (cpm/100 μl)			
T_0 (0-30')	0,45 0,43	44	2641 2658	----	----	----
T_1 (30-60')	0,31 0,31	55	3630 3672	65,7 66,5	0,17 0,17	0,17
T_2 (60-90')	0,26 0,25	63	4970 4836	84,2 82,0	0,18 0,17	0,17
T_3 (90-120')	0,20 0,20	56	6549 6679	110,3 112,4	0,18 0,19	0,19
$n = 3$						
$\bar{X} \pm \text{SE} =$		$58,0 \pm 2,5$		$86,7 \pm 12,9$ $87,0 \pm 13,5$	$0,18 \pm 0,003$ $0,18 \pm 0,007$	

Übersichtstabelle 7: ^{65}Zn -Clearance bei einer SD-Ratte (330 g)

Periode	Urinfluß $\dot{V}_u$ ($\frac{\text{ml}}{30 \cdot \text{min}}$)	linke Niere		rechte Niere		$\frac{^{65}\text{Zn im Urin (U)}}{^{65}\text{Zn im Plasma (P)}}$	$^{65}\text{Zn-Clearance}$ ($\mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 100 \text{g}^{-1}$)
		$^{65}\text{Zn im Plasma}$ (cpm/100 μl)	$^{65}\text{Zn im Urin}$ (cpm/100 μl)	$^{65}\text{Zn im Urin}$ (cpm/100 μl)	$^{65}\text{Zn im Urin}$ (cpm/100 μl)		
T_0 (0-30')	0,19 0,18	549	618	619	-----	-----	-----
T_1 (30-60')	0,18 0,19	632	521	498	0,83	$1,9 \cdot 10^{-3}$	$2,0 \cdot 10^{-3}$
T_2 (60-90')	0,30 0,24	620	436	469	0,71	$2,6 \cdot 10^{-3}$	$1,9 \cdot 10^{-3}$
T_3 (90-120')	0,32 0,27	612	398	417	0,88	$2,3 \cdot 10^{-3}$	$2,0 \cdot 10^{-3}$
$n = 3$					0,81 ± 0,05 0,83 ± 0,05	$2,3 \pm 0,03 \cdot 10^{-3}$	$1,97 \pm 0,03 \cdot 10^{-3}$
$\bar{x} \pm \text{SE} =$		621 ± 6					

Übersichtstabelle 7a: ^{125}I -Clearance bei einer SD-Ratte (330g)

Periode	Urinfluß $\dot{V}_u$ ($\frac{\text{ml}}{30 \cdot \text{min}}$)	linke Niere		rechte Niere		^{125}I im Urin ^{125}I im Plasma (P) (cpm/100 μl)	^{125}I im Urin (U) ^{125}I im Plasma (P)	^{125}I -Clearance ($\mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 100 \text{g}^{-1}$)
		^{125}I im Plasma (cpm/100 μl)	^{125}I im Urin (cpm/100 μl)	^{125}I im Plasma (cpm/100 μl)	^{125}I im Urin (cpm/100 μl)			
T_0 (0-30')	0,19 0,18	141	21464	18223	-----	-----	-----	-----
T_1 (30-60')	0,18 0,19	154	18026	19044	120,0	126,7	0,26	0,24
T_2 (60-90')	0,30 0,24	147	14041	17513	95,2	118,7	0,37	0,31
T_3 (90-120')	0,32 0,27	148	16946	17866	144,8	152,7	0,31	0,32
n = 3								
$\bar{X} \pm \text{SE} =$		$150,0 \pm 2,2$			$120,0 \pm 14,3$ $132,7 \pm 10,3$		$0,31 \pm 0,03$ $0,29 \pm 0,03$	

Übersichtstabelle 8 : ^{65}Zn -Clearance bei einer Wistar-Ratte (264g)

linke Niere	rechte Niere
-------------	--------------

Periode	Urinfluß $\dot{V}_u$ ($\frac{\text{ml}}{30 \cdot \text{min}}$)	^{65}Zn im Plasma (cpm/100 μl)	^{65}Zn im Urin (cpm/100 μl)	$\frac{^{65}\text{Zn im Urin (U)}}{^{65}\text{Zn im Plasma (P)}}$	^{65}Zn -Clearance ($\mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 100 \text{g}^{-1}$)
T_0 (0-30')	0,41 0,35	576	151 161	-----	-----
T_1 (30-60')	0,42 0,40	563	151 151	0,27 0,27	$1,73 \cdot 10^{-3}$ $1,35 \cdot 10^{-3}$
T_2 (60-90')	0,46 0,43	476	153 167	0,29 0,32	$1,69 \cdot 10^{-3}$ $1,39 \cdot 10^{-3}$
T_3 (90-120')	Wegen ansteigendem Plasmaspiegel wurde die Periode T_3 nicht ausgewertet.				
n = 2					
$\bar{x} \pm \text{SE} =$		$519,5 \pm 43,5$		$0,28 \pm 0,01$ $0,30 \pm 0,04$	$1,71 \pm 0,02 \cdot 10^{-3}$ $1,37 \pm 0,02 \cdot 10^{-3}$

Übersichtstabelle 8a: ^{125}I -Clearance bei einer Wistar-Ratte (264g)

Periode	linke Niere		rechte Niere		^{125}I im Urin (cpm/100 μl)	^{125}I im Urin (U) ^{125}I im Plasma (P)	^{125}I -Clearance ($\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 100\text{g}^{-1}$)
	Urinfluß $\dot{V}_u$ ($\frac{\text{ml}}{30\cdot\text{min}}$)	^{125}I im Plasma (cpm/100 μl)	^{125}I im Urin (cpm/100 μl)				
T_0 (0-30')	0,41	190	4133	4497	----	----	----
T_1 (30-60')	0,42	218	4763	4750	23,4	23,3	0,16
T_2 (60-90')	0,46	210	6371	6348	29,8	29,7	0,17
T_3 (90-120')	Wegen ansteigendem Plasmaspiegel wurde die Periode T_3 nicht ausgewertet.						0,12
n = 2							
$\bar{X} \pm \text{SE} =$		$214,0 \pm 4,0$			$26,57 \pm 3,2$	$26,5 \pm 3,2$	$0,17 \pm 0,005$ $0,12 \pm 0$

Übersichtstabelle 9 : ^{65}Zn -Clearance bei einer Wistar-Ratte (305g)

Periode	Urinfluß $\bar{V}_u$ ($\frac{\text{ml}}{30 \cdot \text{min}}$)	linke Niere		rechte Niere		$\frac{^{65}\text{Zn im Urin (U)}}{^{65}\text{Zn im Plasma (P)}}$	^{65}Zn -Clearance ($\mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 100\text{g}^{-1}$)
		^{65}Zn im Plasma (cpm/100 μl)	^{65}Zn im Urin (cpm/100 μl)				
T_0 (0-30')	0,09	436	620	----	----	----	----
T_1 (30-60')	0,09	427	635	613	----	1,47	$1,51 \cdot 10^{-3}$
T_2 (60-90')	0,07	434	798	608	----	1,85	$1,34 \cdot 10^{-3}$
T_3 (90-120')	Wegen fallendem Plasmaspiegel wurde die Periode T_3 nicht ausgewertet.		638	----	----	1,47	$1,22 \cdot 10^{-3}$
n = 2							
$\bar{x} \pm \text{SE} =$		$431,0 \pm 3,5$				$1,66 \pm 0,19$ $1,44 \pm 0,03$	$1,43 \pm 0,09 \cdot 10^{-3}$ $1,19 \pm 0,04 \cdot 10^{-3}$

Übersichtstabelle 9a: ^{125}I -Clearance bei einer Wistar-Ratte (305g)

Periode	Urinfluß $\dot{V}_u$ ($\frac{\text{ml}}{30 \cdot \text{min}}$)	linke Niere rechte Niere		$\frac{^{125}\text{I im Urin (U)}}{^{125}\text{I im Plasma (P)}}$	^{125}I -Clearance ($\mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 100 \text{g}^{-1}$)
		^{125}I im Plasma (cpm/100 μl)	^{125}I im Urin (cpm/100 μl)		
T_0 (0-30')	0,09 0,09	114	39675 40189	----- -----	----- -----
T_1 (30-60')	0,09 0,08	119	42888 40607	369,4 350,0	0,38 0,29
T_2 (60-90')	0,07 0,08	119	58152 46866	488,6 393,8	0,35 0,33
T_3 (90-120')	Wegen fallendem Plasmaspiegel wurde die Periode T_3 nicht ausgewertet.				
n = 2					
$\bar{x} \pm \text{SE} =$		119 ± 0		$429,0 \pm 59,6$ $371,9 \pm 21,9$	$0,37 \pm 0,02$ $0,31 \pm 0,02$

Übersichtstabelle 10: ^{65}Zn -Clearance bei einer Wistar-Ratte (275g)

Periode	Urinfluß $\bar{v}_u$ ($\frac{\text{ml}}{30 \cdot \text{min}}$)	linke Niere		rechte Niere		$\frac{^{65}\text{Zn im Urin (U)}}{^{65}\text{Zn im Plasma (P)}}$	$^{65}\text{Zn-Clearance}$ ($\mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 100 \text{g}^{-1}$)
		$^{65}\text{Zn im Plasma}$ (cpm/100 μl)	$^{65}\text{Zn im Urin}$ (cpm/100 μl)				
T_0 (0-30')	0,34 0,33	448	120 95	----	----	----	----
T_1 (30-60')	0,24 0,25	476	156 133	0,34	0,29	$0,99 \cdot 10^{-3}$	$0,87 \cdot 10^{-3}$
T_2 (60-90')	0,24 0,23	508	151 132	0,31	0,27	$0,89 \cdot 10^{-3}$	$0,74 \cdot 10^{-3}$
$n = 2$							
$\bar{x} \pm \text{SE} =$		$493 \pm 15,0$		$0,33 \pm 0,02$ $0,28 \pm 0,01$		$0,94 \pm 0,05 \cdot 10^{-3}$ $0,81 \pm 0,07 \cdot 10^{-3}$	

Übersichtstabelle 10a: ^{125}I -Clearance bei einer Wistar-Ratte (275g)

Periode	Urinfluß $\dot{V}_u$ ($\frac{\text{ml}}{30 \cdot \text{min}}$)	linke Niere rechte Niere		^{125}I im Urin (cpm/100 μl)	$\frac{^{125}\text{I} \text{ im Urin (U)}}{^{125}\text{I} \text{ im Plasma (P)}}$	^{125}I -Clearance ($\mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$)
		^{125}I im Plasma (cpm/100 μl)	^{125}I im Urin (cpm/100 μl)			
T_0 (0-30')	0,34 0,33	107	7415 5730	-----	-----	-----
T_1 (30-60')	0,24 0,25	101	11783 10270	113,3	98,8	0,34 0,30
T_2 (60-90')	0,24 0,23	101	14522 12522	144,4	124,5	0,42 0,34
$n=2$						
$\bar{x} \pm \text{SE} =$		101 ± 0		$128,9 \pm 15,6$ $111,7 \pm 12,9$		$0,38 \pm 0,04$ $0,32 \pm 0,02$

7.0 Abkürzungen

UF = Ultrafiltrat

C = Clearance (Klärwert)

$[X]_P$ = Konzentration des Stoffes im Plasma

$[X]_U$ = Konzentration des Stoffes im Sammelurin

$\dot{V}_U$ = Urinvolumen pro Zeiteinheit

PAH = Paraaminohippursäure

I.E. = Internationale Einheiten

i.v. = intravenös

SD -

Ratten= Sprague Dawley -Ratten

8.0 Literaturverzeichnis

- 1) Aamodt, R.L., Rumble, W.F., Johnston, G.S., Foster D. and Henkin, R.I. : Zinc metabolism in humans after oral and intravenous administration of Zn-69m .
Am.J.Clin.Nutr. 32,559-569,1979
- 2) Abu-Hamdan, D.K., Migdal, S.D., Whitehouse, R., Prasad, A.S. and Mc Donald, F.D. :
Disparate urinary zinc handling in response to zinc infusion and amino acids.
Clinical Research 27, 707 A ,1979
- 3) Bakir, A.: An update on zinc.
Int.J.Art.Org.2,273 -275,1979
- 4) Bergmann, B. and Wing, K.R. : The turnover of Zn⁶⁵ in rats fed a zinc-deficient diet.
Acta Physiol.Scand.92,451-464,1974
- 5) Bergmann, B. : Concentration of zinc in some hard and soft tissues of rat determined by neutron activation analysis.
Acta Radiol.Ther.Phys.Biol.9,420-432,1970
- 6) Bergmann, B., Sjöström, R. and Wing, K.R.: The variation with age of tissue zinc concentrations in albino rats determined by atomic absorption spectrophotometry.
Acta Physiol.Scand.92,440-450 1974

- 7) Blaurox, M.D. and Cohen, A. : Single-injection clearances of iothalamate- J^{131} in the rat.
Am.J.Physiol.218,542-544,1970
- 8) Mc Cane, R.A. and Widdowson, E.M. : The absorption and excretion of zinc.
Biochem.J.36,692-696,1942
- 9) Cangiano, J.L., Genuth, S.M., Renerts, L. and Bergmann L.B. : Simplified measurement of glomerular filtration rate.
Invest.Urology 9,34-38,1971
- 10) Chapvil, M. : Effect of zinc on cells and biomembranes.
Med.Clin.North Am. 60,799-812,1976
- 11) Christensen, E. and Milman, N. : Serum zinc and urinary zinc excretion after renal allotransplantation.
Scand.J.Clin.Lab.Invest.36,87-93,1976
- 12) Cotzias, G.C., Borg, D.C. and Selleck, B. : Specificity of zinc pathway through the body: Turnover of Zn^{65} in the mouse.
Am.J. Physiol.202,359-363,1962
- 13) Davies, J.T., Musa, M. and Dormandy, T.L. :
Measurements of plasma zinc.
J.Clin.Path. 21,359-365,1968
- 14) Distler, A., Hayduk, K. und Anlauf, M. : Therapie der Hypertonie. Deutsches Ärzteblatt 8,41-51,1982

- 15) Dorn, F. und Günther, T.: Zur hormonalen Regulation des Zink-Stoffwechsels.
Z.klin.Chem.u.klin.Biochem. 8, 618-620, 1970
- 16) Ellis, L.: Serum zinc levels and urinary zinc excretion in patients with renal transplants.
Clin.Chem. Acta 82, 105-111, 1978
- 17) Foster, D.M., Aamodt, R.L., Henkin, R.I. and Berman, M.: Zinc metabolism in humans: A kinetic model
Am.J.Physiol. 237, 340-349, 1979
- 18) Frazier, J.M.: Cadmium and zinc kinetics in rat plasma following intravenous injection.
J.Toxicol.EnvIRON.Health 6, 503-511, 1980
- 19) Giroux, E.L. and Henkin, R.I.: Determination of zinc distribution between albumin and macroglobulin in human serum.
Biochem. Med. 12, 258-266, 1975
- 20) Giroux, E.L. and Henkin, R.I.: Competition for zinc among serum albumin and amino acids.
Biochim. et Biophysica Acta 273, 64-72, 1972
- 21) Graig, F.A. and Siegel, E.: Distribution in blood and excretion of Zn^{65} in man.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 104, 391-394, 1960

- 22) Le Grimellec, Poujeol, C.P. and de Rouffignac, C.:
H³-Inulin and electrolyte concentrations in Bowmans
capsule in rat kidney: Comparison with artificial
ultrafiltration.
Pflügers Arch. 354, 117-131, 1975

- 23) Günther, T., Ruhe, B., Schmalbeck, N. und Tehrani, N.:
Zur Biochemie der Spurenelemente Zink, Kupfer, Mangan,
Molybdän, Chrom und Kobalt: Verteilung, Bindung und
Regulation durch Nebennierenrindenhormone.
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 12, 327-335, 1974

- 24) Halsted, J.A., Smith, J.C. and Irwin, M.I.: A conspectus
of research on zinc requirements of man.
J. Nutr. 104, 345-349, 1974

- 25) Halsted, J.A., Hackley, B., Rudzki, C. and Smith, J.C.:
Plasma zinc concentration in liver disease.
Gastroenterol. 54, 1098-1105, 1968

- 26) Harris, C.A., Baer, P.G., Chirito, E. and Dirks, J.H.:
Composition of mammalian glomerular filtrate.
Am. J. Physiol. 227, 972-976, 1974

- 27) Henkin, R.I., Schulman, J.D., Schulman, C.B. and Brozert D.A.:
Changes in total, nondiffusible and diffusible plasma
zinc and copper during infancy.
The J. of Pediatr. 82, 831-837, 1973

- 28) Henkin, R.I. and Smith, F.R.: Zinc and copper meta-
bolism in acute viral hepatitis.
The Am. J. of Med. Sci. 264, 401-409, 1972

- 29) Hierholzer, K. und Ulmrich, W.: Renale Wirkungen
von Diuretika.
Therapiewoche 30, 2678-2692, 1980

- 30) Hierholzer, K., Butz, M. and Müller-Suur, R.:
Pressure measurements in proximal surface tubules
of the rat-SNGFR and tubuloglomerular feedback.
The Yale Journal of Biology and Medicine 45, 224-232, 1972
- 31) Hierholzer, K., Wiederholt, M., Holzgreve, H., Giebisch, G.,
Klose, R.M. and Windhager, E.E.: Micropuncture study of
renal transtubular concentration gradients of sodium
and potassium in adrenalectomized rats.
Pflügers Arch. 285, 193-210, 1965
- 32) Israelit, A.H., Long, D.L., White, M.G. and Hull, A.R.:
Measurement of glomerular filtration rate utilizing
a single subcutaneous injection of I^{125} -Iothalamate.
Kidney International 4, 346-349, 1973
- 33) Keilin, D. and Mann, T.: Carbonic anhydrase.
Purification and nature of the enzyme.
Biochem. J. 34, 1163-1176, 1940
- 34) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.:
Method for protein determination.
J. Biol. Chem. 193, 265-275, 1951
- 35) Meng, K. und Loew, D.: Diuretika
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S. 188-196, 1974
- 36) Mertz, D.P., Wilk, G. und Loewer, H.: Renale Ausscheidung
von Zink in Abhängigkeit vom Diuresezustand bei nieren-
gesunden und nierenkranken Patienten.
Med. Welt 30, 1048-1052, 1979
- 37) Methfessel, A.H. and Spencer, H.:
Zinc metabolism in the rat.
J. of Appl. Physiol. 34, 58-67, 1973

- 38) Michael, J., Hilton, P. J. and Jones, N. F.:
Zinc and the sodium pump in uremia.
Am. J. Clin. Nutr. 31, 1945-1947, 1978
- 39) Nolph, K. D. and Maher, J. F.:
Calculation of glomerular solute filtration rate.
Nephron 9, 5-9, 1972
- 40) Okunewick, J. P., Schjeide, O. A., Carlsen, E. N. and Hennessy, T. G.:
Distribution of radiozinc in rat plasma.
Nature 198, 966-968, 1963
- 41) Okunewick, J. P., Bond, B. and Hennessy, T. G.:
Behavior of radiozinc in rat plasma.
Am. J. Physiol. 202, 926-930, 1962
- 42) Paschen, K.: Eine neue Mikromethode zum spezifischen
Nachweis von Natrium, Kalium, Calcium und Magnesium in
einer einzigen Serumverdünnung.
Deut. Med. Wochenschrift 51, 2570-2573, 1970
- 43) Paschen, K.: Die Bestimmung des Calciums und seiner
Fraktionen im Serum.
Ärztl. Lab. 25, 13-15, 1979
- 44) Pedersen, K. O.: Determination of calcium fractions of
serum III ionized calcium in ultrafiltrate of normal
serum and examination of pertinent variables.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 25, 223-230, 1970
- 45) Porries, W. J., Strain, W. H., Hsu, J. M. and Woosley, R. L.:
Clinical applications of zinc metabolism.
Charles C. Thomas, Springfield, Ill., 1-132, 1975
- 46) Prasad, A. S.: Clinical, biochemical and pharmacological
role of zinc.
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 20, 393-426, 1979

- 47) Prasad,A.S.: Zinc in human nutrition.
CRC Critic.Rev.Clin.Lab.Sci. 8,1-80 , 1977
- 48) Prasad,A.S.: Trace elements in human health and disease.
Nutrition Foundation Series Vol. 1,Zinc and Copper
Academic Press,New York,San Francisco,London,345-361,1976
- 49) Prasad,A.S. and Oberleas,D.: Binding of zinc to amino
acids and serum proteins in vitro.
J.Lab.Clin.Med. 76,416-425,1970
- 50) Prasad,A.S.,Miale,A.,Farid,Z.,Sandstead,H. and Schu-
lert,A.R.: Zinc metabolism in patients with the syn-
drome of iron deficiency anemia,hepatosplenomegaly,
dwarfism and hypogonadism.
J.of Lab. and Clin. Med. 61,537-549,1963
- 51) Riordan,J.F.: Biochemistry of zinc.
Medical Clinics of North America 60,661-674,1976
- 52) Rose,G.A. and Willden,E.G.: Whole blood,red cell and
plasma total and ultrafiltrable zinc levels in normal
subjects and patients with chronic renal failure with
and without haemodialysis.
Brit.J.Urol. 44,281-286,1972
- 53) Rubini,M.E.,Montalvo,G.,Lockhart,C.P. and Johnson,C.R.:
Metabolism of zinc⁶⁵.
Am.J.Physiol. 200,1345-1348,1961 .
- 54) Sigman,E.M.,Elwood,C.M. and Knox,F.: The measurement of
glomerular filtration rate in man with sodium iothalamate
I¹³¹(Conray).
J.Nucl.Med. 7,60-68,1965

- 55) Sinha, S.N. and Gabrieli, E.R.: Serum copper and zinc levels in various pathologic conditions.
Am.J.Clin.Path. 54, 570-577, 1970
- 56) Spencer, H., Asmussen, C.R., Holtzman, R.B. and Kramer, L.: Metabolic balances of cadmium, copper, manganese and zinc in man.
Am.J.Clin.Nutr. 32, 1867-1875, 1979
- 57) Spencer, H., Rosoff, B. and Feldstein, A.: Metabolism of zinc⁶⁵ in man.
Radiation Research 24, 432-445, 1965
- 58) Sullivan, J.F.: The incidence of low serum zinc in hospitalized patients.
Am.J.Clin.Nutr. 21, 537 A, 1968
- 59) Steele, T.H.: Dissociation of zinc excretion from other cations in man.
J.Lab.Clin.Med. 81, 205-213, 1973
- 60) Stolte, H., Brecht, J.P., Wiederholt, M. und Hierholzer, K.: Einfluss von Adrenalektomie und Glucocorticoiden auf die Wasserpermeabilität corticaler Nephronabschnitte der Ratteniere.
Pflügers Archiv 299, 99-127, 1968
- 61) Vallee, B.L.: Biochemistry, physiology and pathology of zinc.
Physiol.Rev. 39, 443-490, 1959
- 62) Victory, W., Smith, J.M. and Vander, A.J.: Renal tubular handling of zinc.
Fed.Proc. 38, 6149A, 1979

- 63) Wester, P.O.: Urinary zinc excretion during treatment with different diuretics.
Acta Med. Scand. 208, 209-212, 1980
- 64) Wiederholt, M., Hierholzer, K., Windhager, E.E. and Giebisch, G.: Microperfusion study of fluid reabsorption in proximal tubules of rat kidneys.
Am. J. Physiol. 213, 809-818, 1967
- 65) Wing, K.R.: Turnover of Zn^{65} and Sr^{85} in growing rats.
Acta Radiol. 14, 1-24, 1975

Danksagung

Für die Anregung zu dieser Arbeit und die fachliche Unterstützung danke ich Herrn Prof.Dr.K. Hierholzer sehr herzlich.

Für die vielen Ratschläge und Hilfen während der Versuchstätigkeit im Labor bin ich Frau I.Lichtenstein und Herrn H.Siebe sehr dankbar.

Lebenslauf

Am 7.4.1955 wurde ich als vierter Sohn des Studiendirektors Martin Wolschner und seiner Ehefrau Dorothea in Wuppertal geboren.

Nach vier Grundschuljahren und anschließender Gymnasialzeit legte ich am staatlichen naturwissenschaftlichen Gymnasium in Wuppertal 1973 die Reifeprüfung ab.

Anschließend leistete ich im Sanitätsdienst der Bundeswehr meinen Wehrdienst ab.

Zum Wintersemester 1974/75 begann ich an der TU-Hannover mit dem Studium der Biologie und Chemie.

Zum Sommersemester 1976 wurde ich zum Medizinstudium an der Freien Universität Berlin zugelassen. Dort legte ich im Frühjahr 1978 die Ärztliche Vorprüfung ab. Im Oktober 1982 habe ich den letzten Teil des medizinischen Staatsexamens abgeschlossen.

Seit Januar 1983 arbeite ich als Assistenzarzt in der Hals-Nasen-Ohren -Abteilung des Klinikum Steglitz der FU Berlin .

